

# **Charakterisierung von PREL1 (Proline Rich EVH1 Ligand 1)**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr.rer.nat.)  
genehmigte  
D i s s e r t a t i o n

von Andrea Jenzora  
aus Braunschweig

1. Referent: Prof. Dr. Jürgen Wehland

2. Referent: Prof. Dr. Martin Korte

eingereicht am: 27.09.2004

mündliche Prüfung (Disputation) am: 10.12.2004

(Druckjahr 2004)

## Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor dieser Arbeit Prof. Dr. Jürgen Wehland, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### Publikationen

Jenzora, A., B. Behrendt, J.V. Small, J. Wehland, T.E.B. Stradal.(2004). PREL1 links Ras signalling to actin remodelling via Ena/VASP proteins. *FEBS Letters* (in press).

Breitbach, K., K. Rottner, S. Klocke, M. Rohde, A. Jenzora, J. Wehland, I. Steinmetz. (2003). Actin-based motility of *Burkholderia pseudomallei* involves the Arp2/3 complex, but not N-WASP and Ena/VASP proteins. *Cellular Microbiology* **5** (6):385-393

### Tagungsbeiträge

Jenzora, A., B. Behrendt, J. Wehland & T.E.B. Stradal. Characterisation of Proline-rich Protein 48.(Poster) 5th Abercrombie Symposium on Cell Behavior, Oxford, UK (2002).

Jenzora, A., B. Behrendt, J.V. Small, J. Wehland, T.E.B. Stradal. Identification and characterisation of a novel lamellipodial protein, PREL1 (prp48).(Poster) EMBO/FEBS Workshop on Frontiers in Cytoskeleton Research, Gosau, Österreich (2003).

Jenzora, A., B. Behrendt, J.V. Small, J. Wehland, T.E.B. Stradal. PREL1 (prp48) couples Ras signalling to the cytoskeleton via Ena/VASP proteins.(Poster) FEBS lecture course on Cellular Signalling & 4th Dubrovnik Signalling Conference, Dubrovnik, Kroatien (2004).

# Inhaltsverzeichnis

VORVERÖFFENTLICHUNGEN	I
INHALTSVERZEICHNIS	II
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VI
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 DIE AKTINPOLYMERISATION	1
1.2 ORGANISATION DES AKTINZYTOSKELETTS	2
1.2.1 Aktinstrukturen	2
1.2.2 Aktin-bindende Proteine	4
1.3 REGULATION DER AKTINDYNAMIK DURCH KLEINE GTPASEN	5
1.3.1 Regulation durch Ras GTPasen	6
1.3.2 Regulation durch Rho GTPasen	7
1.3.3 Regulation durch Integrine	8
1.4 DER ARP2/3 KOMPLEX	9
1.5 PROLIN UND PROLIN-ERKENNUNGSDOMÄNEN	11
1.5.1 EVH1 Domänen	12
1.5.2 SH3 Domänen	13
1.5.3 WW Domänen	14
1.5.4 Profilin	14
1.6 DIE ENA/VASP PROTEIN FAMILIE	15
1.7 GRB-PROTEIN FAMILIE DER SIGNAL-ADAPTOREN	18
1.8 ZIEL DER DISSERTATION	19
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>21</b>
2.1 MATERIALIEN	21
2.2 MIKROBIOLOGISCHE KULTUREN	21
2.3 KULTURBEDINGUNGEN	22
2.4 ZELLKULTUR	22
2.4.1 Verwendete Kultur-Medien und Lösungen	22
2.4.2 Verwendete Zelllinien und Vollmedien	23
2.5 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	24
2.5.1 Plasmide	24
2.5.2 Oligonukleotide und Expressed sequence tags (EST) Klone	25
2.5.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	26

2.5.4 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	27
2.5.5 Agarosegelelektrophorese	27
2.5.6 Aufreinigung von DNA-Fragmenten	29
2.5.7 Dephosphorylierung von Vektor-DNA	29
2.5.8 Ligation von DNA	29
2.5.9 Herstellung kompetenter <i>Escherichia coli</i>	30
2.5.10 Transformation von <i>Escherichia coli</i>	30
2.5.11 TOPO-TA-Klonierung	31
2.5.12 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	31
2.5.13 Mutagenese	32
2.5.14 DNA-Sequenzierung	32
2.5.15 Isolierung von Gesamt-RNA und mRNA	33
2.5.16 Herstellung von cDNA aus RNA	34
2.5.17 Northern Blot	34
2.6 BIOCHEMISCHE METHODEN	36
2.6.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	36
2.6.2 Coomassie-Färbung	37
2.6.3 Expression und Reinigung von GST-Fusionsproteinen	37
2.6.4 Immunpräzipitation und pull down	39
2.6.5 Protein-Overlay assay auf immobilisierten Peptiden und Lipiden	40
2.6.6 Ras Aktivierungs assay (Ras activation assay)	40
2.7 IMMUNOLOGISCHE METHODEN	41
2.7.1 Western Blot	41
2.7.2 Immunfärbung und Detektion mittels Chemilumineszenz	41
2.7.3 Generierung von Antikörpern	42
2.7.4 Reinigung polyklonaler Antikörper	43
2.8 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	44
2.8.1 Standardkultur	44
2.8.2 Allgemeine Gewebekulturarbeiten	44
2.8.2.1 Kultur auf Deckgläschen	44
2.8.2.2 Passagieren von Zellen	45
2.8.2.3 Einfrieren und Auftauen	45
2.8.2.4 Interaktion von CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen mit Antigenpräsentierenden Zellen (APCs)	45
2.8.3 Transfektion eukaryotischer Zellen	46
2.8.4 Herstellung von Zellextrakten	46
2.8.5 Stimulierung mit Phorbolester	47
2.9 DIGITALE FLUORESZENZMIKROSKOPIE	47

2.9.1 Immunfluoreszenzmikroskopie fixierter Zellen	48
2.9.2 Fluoreszenzmikroskopie lebender Zellen	50
2.9.3 Spreading assay	51
2.9.4 Konfokale Mikroskopie	51
2.10 VERWENDETE ANTIKÖRPER	52
<b>Tabelle 1</b> : Verwendete primäre Antikörper	52
<b>Tabelle 2</b> : Verwendete sekundäre Antikörper	53
2.11 VERWENDETE KONSTRUKTE	53
<b>Tabelle 3</b> : Konstrukte für bakterielle Expression	53
<b>Tabelle 4</b> : Konstrukte für eukaryotische Expression	53
<b>3 ERGEBNISSE</b>	<b>54</b>
3.1 PREL1 GEHÖRT ZU DER FAMILIE DER GRB-ADAPTOREN	54
3.2 TOOLS ZUR CHARAKTERISIERUNG VON PREL1	56
3.2.1 Herstellung von PREL1 Konstrukten	56
3.2.2 Polyklonale Antikörper gegen PREL1	60
3.2.3 Northern Blot Analyse	64
3.3 IDENTIFIZIERUNG VON PREL1-BINDUNGSPARTNERN ANHAND DER DOMÄNENSTRUKTUR	65
3.3.1 Prolinreiche Sequenzen in PREL1 binden an EVH1 und SH3 Domänen	65
3.3.2 Die PH Domäne von PREL1 bindet Phosphatidylinositol-Monophosphate	70
3.3.3 Die RA Domäne von PREL1 bindet lipid-abhängig an die kleine GTPase Ras	71
3.4 DIE AKTIVITÄT VON RAS KORRELIERT MIT DER LOKALISATION VON PREL1	72
3.5 EINE ERHÖHUNG DER RAS AKTIVITÄT FÜHRT ZUR TRANSLOKATION VON PREL1 IN ADHÄSIONSSTRUKTUREN	74
3.6 PREL1 LOKALISIERT IN DER IMMUNOLOGISCHEN SYNAPSE	78
3.7 PREL2 (KIAA1681)	81
<b>4 DISKUSSION</b>	<b>84</b>
4.1 DIE PREL-PROTEINFAMILIE	84
4.1.1 PREL1 gehört zu der Familie der Grb-Adaptor Proteine	84
4.1.2 PREL1 und PREL2 bilden eine neue Genfamilie	85
4.2 PREL1 BINDET AN DIE EVH1 DOMÄNE DER ENA/VASP PROTEINE	86
4.3 PREL1 BINDET LIPIDABHÄNGIG AN RAS	88
4.4 DIE LOKALISATION VON PREL1 KORRELIERT MIT DER AKTIVITÄT VON RAS	89

4.5 DIE AKTIVIERUNG VON RAS FÜHRT ZU EINER REKRUTIERUNG VON PREL1 AN DAS AKTINZYTOSKELETT	90
4.6 PREL1 INTERAGIERT MIT PROTEINEN, DIE SH3 DOMÄNEN ENTHALTEN	91
4.7 PREL1 LOKALISIERT IN PODOSOMEN	95
4.8 PREL1 LOKALISIERT IN DER IMMUNOLOGISCHEN SYNAPSE	95
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>98</b>
<b>6 Literaturverzeichnis</b>	<b>100</b>
<b>7 Abkürzungen und Übersetzungen</b>	<b>109</b>
<b>8 Danksagung</b>	<b>112</b>

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Das Tretmühlen-Phänomen	2
Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Aktinstrukturen einer Zelle	3
Abbildung 1.3: Ras ist involviert in verschiedene Signalwege	6
Abbildung 1.4: H-Ras vermittelte Integrin-Regulation in Fibroblasten	9
Abbildung 1.5: Schematische Darstellung des Arp2/3 Komplexes	9
Abbildung 1.6: Modelle der Aktinnukleation durch den Arp2/3 Komplex	10
Abbildung 1.7: Die Familie der Ena/VASP Proteine und ihre Bindungspartner	16
Abbildung 1.8: Domänenstruktur und Bindungspartner der Grb-Protein Familie	19
Abbildung 2.1: Plasmid-Karten der pEGFP-C1 und -N1 Fusionsvektoren	24
Tabelle 1: Verwendete primäre Antikörper	52
Tabelle 2: Verwendete sekundäre Antikörper	52
Tabelle 3: Konstrukte für bakterielle Expression	53
Tabelle 4: Konstrukte für eukaryotische Expression	53
Abbildung 3.1: Domänenstruktur und Aminosäuresequenz von murinem PREL1	54
Abbildung 3.2: PREL1 gehört zu der Familie der Grb-Adaptor Proteine	56
Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte	57
Abbildung 3.4: Expression der GFP-Konstrukte von PREL1 in NIH3T3 Zellen	58
Abbildung 3.5: Lokalisation von GFP-PREL1 in B16F1 Zellen auf Laminin	59
Abbildung 3.6: Herstellung von PREL1 <sub>1-420</sub> als GST-Fusionsprotein	60
Abbildung 3.7: Western Blot Analyse des polyklonalen anti-PREL1 Antikörpers 1-420	62
Abbildung 3.8: Immunfluoreszenzen des polyklonalen PREL1 Antikörpers 1-420	63
Abbildung 3.9: Western Blot Analyse der polyklonalen Peptid-Antikörper 5505-12 und 5505-13 auf Zellextrakten	63
Abbildung 3.10: PREL1 ist hochexprimiert im haematopoetischen System	65
Abbildung 3.11: PREL1 bindet an die EVH1 Domäne von Mena	66
Abbildung 3.12: PREL1 bindet über zwei Motive die EVH1 Domäne von Mena	67
Abbildung 3.13: Die prolinreichen Sequenzen in PREL1 präzipitieren EVH1 und SH3 Domänen enthaltende Proteine	69
Abbildung 3.14: PREL1 wird über die SH3 Domänen von Grb2 und Nck1 präzipitiert	70
Abbildung 3.15: Lipid-Overlay mit der PH Domäne von PREL1	71
Abbildung 3.16: PREL1 präzipitiert Ras <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	72
Abbildung 3.17: Ras-Aktivierung korreliert mit der Lokalisation von PREL1 in NIH3T3 Fibroblasten	74
Abbildung 3.18: Lokalisation von GFP-PREL1 nach TPA-Stimulierung	75



Abbildung 3.19: GFP-PREL1 lokalisiert in Fokalkontakten nach H-RasV12 Mikroinjektion	76
Abbildung 3.20: PREL1 lokalisiert in Podosomen in A7r5 Zellen	77
Abbildung 3.21: Molekulare Komponenten in Podosomen	78
Abbildung 3.22: PREL1 lokalisiert an der Immunologische Synapse (IS)	80
Abbildung 3.23: Die dreidimensionale Darstellung der PREL1 Lokalisation in der IS verifiziert die Anreicherung von PREL1	81
Abbildung 3.24: Aminosäuresequenzvergleich zwischen PREL1 und PREL2	82
Abbildung 3.24: PREL2 lokalisiert an der lamellipodialen Spitze und an der Spitze von Filopodien	83
Abbildung 4.1: Interaktionsmodel des PREL1-Komplexes in Fokalkontakten	94
Abbildung 4.2: PREL1 ist Teil eines multimolekularen Komplexes an der IS	97

# 1 Einleitung

Das Zytoskelett von eukaryotischen Zellen spielt eine zentrale Rolle bei Bewegungsabläufen. Die wesentlichen Bestandteile sind die Intermediärfilamente, die Mikrotubuli und das Aktinfilamentsystem. Neben den Mikrotubuli ist das Aktinfilamentsystem die dynamischste Komponente und Aktin eines der am häufigsten vorkommenden Proteine in eukaryotischen Zellen. Aktin vermittelte Zellbewegung ist essentiell für Prozesse wie Wundheilung, Embryogenese, Phagozytose, die Immunantwort oder für die Metastasierung von Tumorzellen, weshalb die Erforschung dieser Vorgänge von elementarer Bedeutung ist.

Wichtige Komponenten in der Regulation aktinvermittelter Zellbewegung sind die Ena/VASP Proteine. Sie haben verschiedene Effekte auf Bewegungsvorgänge und die Motilität von Zellen, über ihre genaue Funktion wird jedoch eine lebhafte Diskussion geführt. Die Identifizierung neuer Bindungspartner von Ena/VASP Proteinen kann daher dazu beitragen ihre Funktion besser zu verstehen.

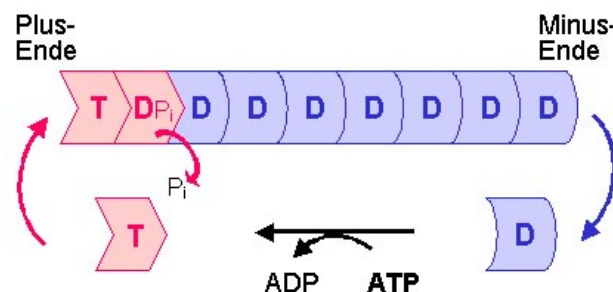
In dieser Arbeit wurde ein neuer Ligand der Ena/VASP Proteine, PREL1 (Proline Rich EVH1 Ligand 1), untersucht und charakterisiert. Die Identifizierung von potentiellen Bindungspartnern und die Lokalisation des PREL1 Proteins in verschiedenen Zellsystemen sollten Hinweise auf eine mögliche Funktion des Proteins in zellulären Bewegungsvorgängen geben.

## 1.1 Die Aktinpolymerisation

Aktin (43kDa) ist hoch konserviert und eines der am häufigsten vorkommenden Proteine in eukaryotischen Zellen. Es ist in eine Vielzahl von zellulären Aktivitäten involviert, wie die Veränderung der Zellform und die Zellbewegung (Mitchison and Cramer, 1996; Small, 1994). Diese Prozesse basieren auf der dynamischen Reorganisation des Aktinzytoskeletts, was durch Polymerisation und Depolymerisation von Aktinfilamenten erreicht wird (Welch et al., 1997b). Aktin ist ein ATP-bindendes Protein, das als Monomer als globuläres Aktin (G-Aktin) in den Zellen vorliegt und durch eine reversible, nicht kovalente Bindung zu Filamenten (F-Aktin) polymerisieren kann. Der erste Schritt in der Neubildung eines Aktinfilamentes wird Nukleation genannt und benötigt die transiente Bildung eines

Trimers, welches durch die Anlagerung eines vierten Monomers stabilisiert wird, um so ein neues Filament zu erzeugen (Korn et al., 1987). Kinetisch haben Aktinfilamente zwei Enden, ein schnell wachsendes („barbed end“ oder (+)-Ende) und ein langsam wachsendes („pointed end“ oder (-)-Ende). Die Konzentration an monomerem Aktin, die für eine kontinuierliche Anlagerung von Monomeren benötigt wird (Kritische Konzentration,  $C_c$ ), ist am (+)-Ende 12 mal niedriger als am (-)-Ende (Wegner and Isenberg, 1983). Bei einer Monomer-Konzentration zwischen der kritischen Konzentration für das (+)- und (-)-Ende können Aktinuntereinheiten durch das Filament „hindurchwandern“, was durch die Anlagerung am (+)-Ende und Dissoziation vom (-)-Ende vermittelt wird. Dieser Vorgang wird als Tretmühlen-Phänomen bezeichnet (siehe auch Abbildung 1.1; Carlier and Pantaloni, 1997; Pantaloni et al., 2001).

Das Tretmühlen-Phänomen ist ein wichtiges Charakteristikum der Aktinfilament-Dynamik und spielt eine entscheidende Rolle bei Aktin-abhängigen Bewegungsabläufen, wie der Ausbildung von Lamellipodien (siehe Kapitel 1.2.1; Small, 1995; Wang, 1985).



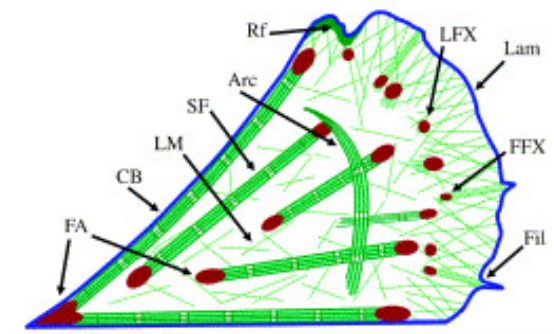
**Abbildung 1.1: Das Tretmühlen-Phänomen.** Das Tretmühlenphänomen spiegelt das energetische Ungleichgewicht zwischen Plus-Ende und Minus-Ende wieder. Der Geschwindigkeits-bestimmende Schritt im Aktin-ATPase Zyklus ist die Dissoziation am Minus-Ende, die die Geschwindigkeit des Wachstums am Plus-Ende kontrolliert. Die Konzentration am Plus-Ende an ATP-gebundenem G-Aktin ist im Gleichgewichtszustand (nach Pantaloni et al., 2001).

## 1.2 Organisation des Aktinzytoskeletts

### 1.2.1 Aktinstrukturen

Das Aktinzytoskelett spielt eine entscheidende Rolle in der Bewegung einer Zelle über das Substrat. Dabei sind Aktinfilamente an einer Vielzahl der für die Bewegungen notwendigen Prozesse beteiligt. Diese dynamischen Aktinstrukturen

erfüllen verschiedene Funktionen in der Zelle (Small et al., 1999; Small, 1988). Strukturen, die einen Vorschub der Zelle bewirken, nennt man Protrusionen. Die Filamente sind dicht angeordnet und sind mit ihrem (+)-Enden in die Vorschubrichtung orientiert (Small, 1988).



**Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Aktinstrukturen einer Zelle.** (Lam) Lamellipodium; (Fil) Filopodium; (FA) Fokalkontakte; (SF) Stressfasern; (FFX, LFX) Fokale Komplexe; (Rf) ruffle (nach Kaverina et al., 2001).

In Filopodien, sogenannte ‘Membranfinger’, sind die Filamente in dichten parallelen Aktinbündeln angeordnet und werden durch quervernetzende Proteine (z.B. Fimbrin) zusammengehalten (Matsudaira, 1994). In Lamellipodien, die einen breiten flachen Saum an der Membran darstellen, sind die Filamente in einem dichten Netzwerk von diagonal angeordneten Aktinfilamenten angeordnet (Small et al., 2002) und durch flexible quervernetzende Proteine, wie Filamin, verbunden (Matsudaira, 1994).

Zusätzlich können Lamellipodien radiär angeordnete Bündel an Filamenten enthalten, die als ‘mikrospikes’ bezeichnet werden und die die gleiche Orientierung der Aktinfilamente zeigen ((+)-Enden nach vorne) wie die Filamente im diagonalen Netzwerk (Small, 1982; Small et al., 1978). Lamellipodien können am Substrat adhären oder sich durch Membranaufwerfungen (‘ruffles’) über der Zelle zurückfallen (Abercrombie et al., 1970).

Eine Anheftung der Zelle ist notwendig, um Protrusionen in eine Bewegung über das Substrat umzusetzen. An den Anheftungsstellen wird die Kraft auf das Substrat übertragen und durch Kontraktion von Myosin vermittelt. Dieser Prozess führt zu einer Vorwärtsbewegung des Nukleus und des Zellkörpers und wird als Zugkraft bezeichnet. Der letzte Schritt in den Bewegungsabläufen enthält zwei Prozesse: die Ablösung und die Retraktion, wobei Verbindungen zum Substrat gelöst und der hintere Teil der Zelle vorwärts gezogen wird. Diese Zell-Matrix Verbindungen werden als Fokalkontakte oder Fokale Adhäsionspunkte (FA) bezeichnet. Es sind Strukturen mit denen Stressfasern (s.u.) an einem Ende fest mit dem Substrat

verbunden sind. Neben der Funktion der Verankerung haben Fokalkontakte auch die Aufgabe, Signale von der Extrazellulären Matrix an das Zytoskelett weiterzuleiten. Stressfasern sind auch dynamische Strukturen, in denen Aktinfilamente dicht parallel angeordnet sind und die der Aufrechterhaltung der Spannung und der Kontraktion der Zelle dienen (Izzard and Lochner, 1976). Sie zeichnen sich durch die Assoziation mit Myosin aus und bilden den kontraktilen Apparat der Zelle.

Neben Fokalkontakten bilden Podosomen den prominentesten Teil des Aktinzytoskeletts in Zellen monozytischen Ursprungs, wie Makrophagen, Osteoklasten und Dendritische Zellen. Sie können aber auch in transformierten Fibroblasten und Glattmuskel-Zellen auftreten.

Der Hauptunterschied zwischen Fokalkontakten und Podosomen ist die Anwesenheit des Arp2/3 Komplexes, der für die Aktinpolymerisation verantwortlich ist. Im Ringkomplex der Podosomen befinden sich Adhäsionsmoleküle, wie Integrine, Vinculin und Talin. Im dynamischen Zentrum („Core“) befinden sich Proteine, die an der Aktinpolymerisation beteiligt sind, wie der Arp2/3 Komplex, N-WASP und Ena/VASP Proteine (Linder and Aepfelbacher, 2003).

### 1.2.2 Aktin-bindende Proteine

Aktin-bindende Proteine regulieren die Länge und Stabilität von Aktinfilamenten (Carlier and Pantaloni, 1997). Dabei lassen sich die Proteine unterscheiden in Monomer-bindende Proteine, die die Verfügbarkeit von unpolymerisiertem Aktin kontrollieren. Dazu gehören z.B. Thymosin  $\beta_4$ , das G-Aktin komplexiert, wodurch dieses nicht polymerisieren kann (Sun et al., 1995) und Profilin, welches als Nukleotid-Austauschfaktor dient und den Austausch von ADP zu ATP an G-Aktin katalysiert (siehe Kapitel 1.5.4; Goldschmidt-Clermont et al., 1991).

Durch F-Aktin zerschneidende („severing“) Fragmentierungs-Proteine werden neue (+)-Enden hergestellt, indem Filamentbrüche erzeugt werden (Pantaloni et al., 2001). Dazu gehört auch ADF (Aktin Depolymerisations Faktor) /Cofilin, welches die Herstellung neuer Filamente fördert, indem die Depolymerisation am (-)-Ende der Aktinfilamente beschleunigt wird (Carlier et al., 1997). „Capping“-Proteine regulieren die Zugänglichkeit freier (+)-Enden, indem sie Aktinfilamente am (+)- und (-)-Ende

besetzen können und die Filamente vor Polymerisation und Depolymerisation geschützt werden. Durch Capping am (+)-Ende können diese Proteine eine Depolymerisation am (-)-Ende einleiten, um nicht mit Capping-Proteinen besetzte Filamente an anderer Stelle schnell zu verlängern (Carlier and Pantaloni, 1997; Schafer and Cooper, 1995; Sun et al., 1995; Weber et al., 1991).

Eine Vielzahl an F-Aktin Binde- und Bündelungsproteinen stabilisieren zudem das filamentöse Aktin und verschieben das Gleichgewicht zugunsten der polymerisierten Form (Welch, 1999).

Der am besten charakterisierte zelluläre Faktor, der Aktinfilamente *de novo* erzeugt, ist der Arp2/3 Komplex. Der Prozess der Aktinnukleation durch den Arp2/3 Komplex ist in Kapitel 1.4 erläutert.

### 1.3 Regulation der Aktindynamik durch kleine GTPasen

GTPasen der Ras Superfamilie agieren als molekulare Schalter, die eine grosse Anzahl an essentiellen biochemischen Signalwegen in eukaryotischen Zellen kontrollieren. Die Ras und Rho Familien sind in diesem Zusammenhang von besonderem Interesse, weil sie intrazelluläre Signaltransduktionswege an Veränderungen in der externen Umgebung koppeln. Wie alle GTPasen können sie in einer inaktiven, GDP-gebundenen, und einer aktiven, GTP-gebundenen, Konformation vorliegen. Guanin-Nukleotid-Austausch Faktoren (GEFs) katalysieren die Freisetzung von GDP und erlauben die Bindung von GTP, dessen intrazelluläre Konzentration in den Zellen höher ist, als die von GDP. In ihrem aktiven, GTP gebundenen Zustand interagieren Ras und Rho GTPasen mit ihren Zielproteinen, um so zelluläre Signale zu übertragen. Eine intrinsische GTPase Aktivität, katalysiert durch GTPase aktivierende Proteine (GAPs), vervollständigt den Zyklus und die GTPase kehrt in seinen inaktiven, GDP gebundenen Zustand zurück (Bar-Sagi and Hall, 2000). In drei Punkten zeigt sich die Diversität der Signaltransduktionswege der Ras und Rho GTPasen: 1) bei den Membran Rezeptoren und ‚upstream‘ Regulatoren, die die GTPasen aktivieren können, 2) in der Vielfalt der zellulären Zielproteine, die mit individuellen GTPasen interagieren können und 3) durch extensiven Austausch und Kooperation (‚crosstalk‘) zwischen den von GTPasen regulierten Signaltransduktionswegen (Bishop and Hall, 2000).

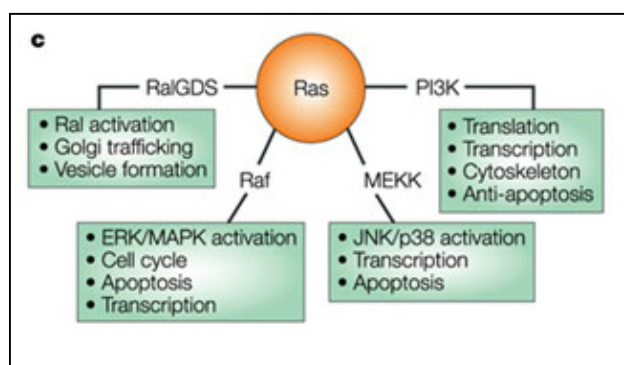
### 1.3.1 Regulation durch Ras GTPasen

Die Subfamilie der Ras GTPasen beinhaltet 13 Mitglieder, die in 5 Subgruppen unterteilt werden können. Neben den vier Ras Proteinen, H-Ras, K-Ras, N-Ras und R-Ras, gehören zu dieser Subfamilie die Ral Proteine, die Raps und Rheb. Zwei neu entdeckte kleine GTPasen, Rin und Rit, wurden kürzlich der Familie hinzugefügt (Reuther and Der, 2000).

Mutationen in Ras oder seinem ‚downstream‘ Effektor, der Proteinkinase Raf, kommen in einer Vielzahl von Tumoren vor. Onkogene Transformationen von Zellen durch Ras und Raf führen zu einer dramatischen Veränderung der Zellmorphologie, der Adhäsion, der Motilität und der intrazellulären Architektur (Woodrow et al., 2003). Diese Veränderungen beinhalten 1) den Verlust von Kontaktinhibierung begleitet von der Auflösung von Aktinstressfasern (SF), 2) der Auflösung von Fokalen Adhäsionspunkten, 3) Abrunden der Zellen und 4) erhöhte Motilität und Invasion (Woods et al., 2001).

Wird Ras durch Mitogene, wie Wachstumsfaktoren, Serum oder Phorbolester, aktiviert, kommt es zu einer Aktivierung der Signalkaskade über Raf und den ERK (Extracellular signal-regulated kinase)/MAP (Mitogen Aktivierte Protein)-Kinase Signalweg (siehe Abb. 1.4).

Auch eine Aktivierung von Integrinen führt zu einer Aktivierung des ERK/MAPK Signalweges. Es wurde gezeigt, dass Ras einen essentiellen Beitrag zur Zellbewegung liefert, und dass eine Inhibierung von Ras zu einer verminderten Zellmigration führt. Des weiteren ist Ras in die Umstrukturierung von Fokalkontakten involviert (Nobes and Hall, 1999). In welchen Signalwegen Ras eine Rolle spielt und welche Effekte eine Ras Aktivierung auf die Zellen haben kann, ist in Abbildung 1.3 dargestellt.



**Abbildung 1.3: Ras ist in verschiedene Signalwege involviert.**

Ras kann über die ‚downstream‘ Effektoren RalGDS, Raf, MEKK und der PtdIns(3)P-Kinase (PI3K) eine Vielzahl von Effekten auf das Zytoskelett, die Apoptose oder die Vesikelbildung haben (nach Kinbara et al., 2003).

### 1.3.2 Regulation durch Rho GTPasen

Es wurden bis heute 20 Proteine der Rho Familie im Menschen identifiziert, von denen die am besten charakterisierten die Mitglieder RhoA/B, Rac1/2 und Cdc42 sind. Ein Konzept, bei welchem Rho GTPasen die Zellmigration regulieren, wurde aus der Beobachtung hergeleitet, dass diese GTPasen die Formation von spezifischen Aktin-enhaltenden Strukturen steuern (Hall, 1998). Rho GTPasen regulieren verschiedene andere Prozesse, die relevant sind für Zellbewegung, wie Zell-Substrat Adhäsion, Zell-Zell Adhäsion, Proteinsekretion, Vesikeltransport und Transkription (Ridley, 2001b). Sie stellen dabei eine Verbindung von Wachstumsfaktoren, die durch Bindung an membranständige Rezeptoren als extrazelluläre Signale wirken, zum Aktinzytoskelett her (Hall, 1998).

Rho kann durch Wachstumsfaktoren wie LPA (Lysophosphatidsäure) aktiviert werden und bewirkt die Bildung von Stressfasern und Fokalkontakten (Ridley and Hall, 1992). Rac ist notwendig für die Ausbreitung von Lamellipodien, induziert durch Wachstumsfaktoren, Zytokine und Extrazelluläre Matrix Komponenten. Zellen, in denen Rac inhibiert ist, können nicht migrieren (Allen et al., 1998; Nobes and Hall, 1999). Ausserdem ist Rac notwendig für die Bildung von Fokalen Komplexen (Allen et al., 1997; Rottner et al., 1999b), die in langsam wandernden Zellen, wie Fibroblasten, zu Rho-induzierten Fokalkontakten reifen können (Rottner et al., 1999b). Die Rolle von Cdc42 in Zellen ist es, die Aktinpolymerisation zu initiieren, die für die Verlängerung von Filopodien notwendig ist. Cdc42 ist wichtig für die Ausbildung und Beibehaltung der Polarität während der Chemotaxis, wie in Neuronen (Nobes and Hall, 1999) und hat weiterhin eine Funktion in der Regulation des Vesikeltransports (Ridley, 2001a).

### 1.3.3 Regulation durch Integrine

Integrine sind Zelloberflächen-Rezeptoren, die Komponenten der Extrazellulären Matrix (ECM) binden. Sie beeinflussen dadurch Zelladhäsion, Migration und Wachstum. Integrine bestehen aus einem Heterodimer aus  $\alpha$  und  $\beta$  Untereinheiten. Beide Untereinheiten haben eine aminoterminal extrazelluläre Domäne, die die Plasmamembran einmal durchspannt und eine zytoplasmatische Domäne, die der Signalübertragung und der Bindung an Fokalkontakt-Proteine dient (siehe Abb. 1.4).

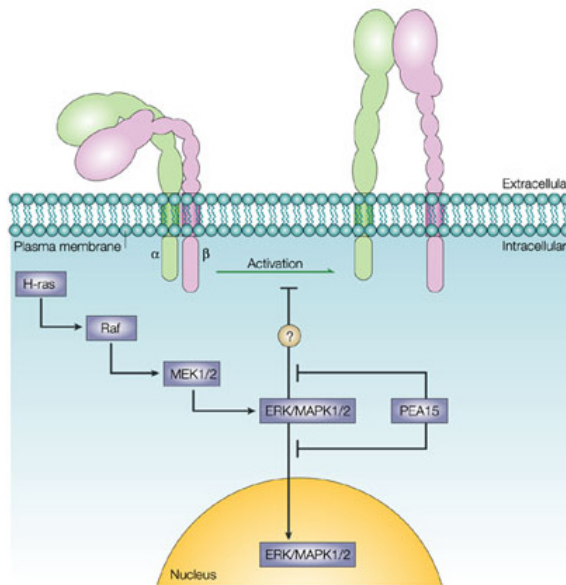


Als essentieller Linker zwischen der ECM und dem Zytoskelett übertragen Integrine Signale von der ECM, um eine zytoskeletale Reorganisation zu fördern und eine intrazelluläre Signalübertragung in einem Prozess, der im Allgemeinen als ‚outside-in‘ Integrin-Signalweg bezeichnet wird, zu initiieren (Kinbara et al., 2003).

Die Affinität von Integrinen für ECM Proteine kann zudem durch intrazelluläre Signale moduliert werden (‚inside-out‘ Signalübertragung). Die Brücke, die Integrine zwischen dem intrazellulären Aktinzytoskelett und der ECM formen, erlaubt den Zellen Kräfte auf ihre Umgebung auszuüben. Diese Kräfteerzeugung ist für viele zelluläre Prozesse, wie die effiziente Zellbewegung, kritisch (Holly et al., 2000).

RasGTPasen können durch Integrine aktiviert werden, und obwohl nicht bekannt ist, dass sie direkt mit Integrinen interagieren, haben sie eindeutige Effekte auf die Funktion der Integrine. Ras aktiviert dabei einen Signalweg über ERK/MAP Kinasen (siehe Abb. 1.4), welche auch aktiviert werden, wenn Zellen auf ECM Proteinen (Fibronectin, Laminin, Kollagen) adhärieren (Cheng et al., 1994), was die Vermutung zulässt, dass Integrin-Matrix Interaktionen die MAP Signalkaskade aktiviert. Eine Anheftung an Fibronectin stimuliert zusätzlich die Tyrosin-Phosphorylierung der Fokalen Adhäsions Kinase (FAK) sowie seine Assoziation mit anderen Signalmolekülen (Src und Grb2/Sos), die Ras aktivieren und zu einer Aktivierung des Ras Signalweges führen (Schlaepfer et al., 1994).

Es konnte gezeigt werden, dass H-Ras eine Integrinaktivierung in Fibroblasten unterdrückt (Hughes et al., 2002), in anderen Zelltypen aber eine Aktivierung von Integrinen fördert (Kinbara et al., 2003). In lymphoiden Zellen wurde zudem beobachtet, dass anti-Integrin Antikörper einen Einfluss auf die Beladung von Ras mit GTP haben (Kapron-Bras et al., 1993).

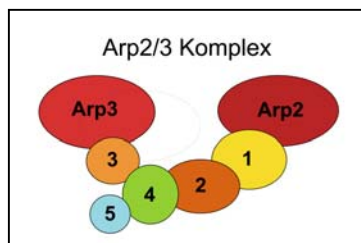


**Abbildung 1.4: H-Ras vermittelte Integrin-Regulation in Fibroblasten.**

H-Ras aktiviert den Raf-MEK-ERK/MAPK Signalweg, welcher sich auf die Unterdrückung der Integrin Aktivierung auswirkt. ERK, extracellular signal-regulated kinase; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MEK, MAPK und ERK Kinase (nach Kinbara et al., 2003).

## 1.4 Der Arp2/3 Komplex

Der Arp2/3 Komplex besteht aus sieben Untereinheiten, die eng miteinander verbunden sind (Machesky et al., 1994). Dazu gehören die Aktin-verwandten Proteine Arp2 (ACTR2) und Arp3 (ACTR3) und die fünf zusätzlichen Proteine ARPC (Arp2/3 Complex Component) 1, ARPC2, ARPC3, ARPC4 und ARPC5.



**Abbildung 1.5: Schematische Darstellung des Arp2/3 Komplexes.**

Arp2 und Arp3 binden an verschiedene kleine Untereinheiten. Arp, Actin related protein; 1-5, ARPC 1-5 (nach Small et al., 2002).

Die Zusammensetzung seiner Untereinheiten ist in allen Organismen konserviert. Der gereinigte Arp2/3 Komplex verfügt über zwei wichtige biochemische Aktivitäten: durch Aktivierung von einer Klasse von Proteinen, die sogenannten NPFs („nucleation promoting factors“) nukleiert er neue Aktinfilamente als Antwort auf ‚upstream‘ Signale (Mullins and Pollard, 1999). Zusätzlich quervernetzt er neu geformte Filamente in einer Y-Anordnung mit einem charakteristischen Winkel von 70° zwischen den Filamenten und stabilisiert die Vernetzung *in vitro* und *in vivo* (Svitkina and Borisy, 1999). Die Koordination der zwei Aktivitäten des Arp2/3 Komplexes erfolgt simultan durch die Generation neuer Filamente und die Verbindung dieser in

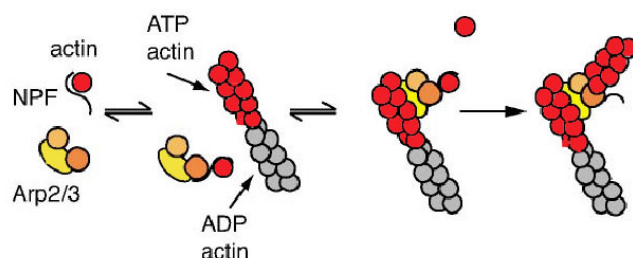
ein dichtes Netzwerk in den Zellen (Welch and Mullins, 2002).

Zwei Modelle werden in der Literatur gegenüber gestellt, die die Kopplung der Nukleation und die Verzweigung durch den Arp2/3 Komplex beschreiben (siehe Abbildung 1.6). Eine Beobachtung beruht auf Daten, in denen der Arp2/3 Komplex an die Seiten und (-)-Enden von Aktinfilamenten bindet (Mullins et al., 1998), zusammen mit der Beobachtung, dass der Arp2/3 Komplex neue Filamente nukleiert, wenn er durch NPFs der WASP/Scar Familie und vorgeformte Aktinfilamente stimuliert wird (Machesky et al., 1999). Dies führte zu dem dendritischen Nukleations-Modell der Arp2/3 Aktivität (Pollard et al., 2000), welches postuliert, dass der Arp2/3 Komplex durch NPFs aktiviert wird, um dann durch die Bindung an der Seite eines existierenden Mutterfilaments ein Tochterfilament zu nukleieren.

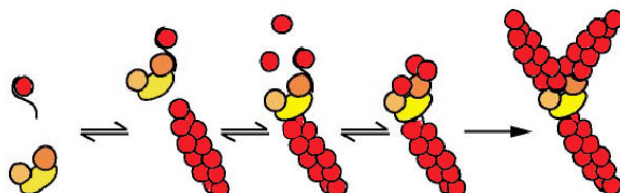
Ein etwas anderes Model wurde von Pantaloni et al. (2000) vorgeschlagen. Dabei wird behauptet, dass der Arp2/3 Komplex ein verzweigtes Netzwerk generiert, er aber nicht an die Seiten der Filamente bindet. Die (+)-Enden bereits vorhandener Aktinfilamente stimulieren eine Arp2/3-abhängige Nukleation, und ein ‚capping‘ der (+)-Enden dieser Filamenten blockiert die Nukleation.

Diese Beobachtungen führen zu dem ‚barbed end branching‘ Model (Verzweigung an den Plus-Enden), in dem der aktivierte Arp2/3 Komplex an die schnell wachsenden (+)-Enden der Filamente ko-polymerisiert und eine Verzweigung der Filamente induziert, woraus zwei gleich lange Tochterfilamente resultieren (Pantaloni et al., 2000).

A. Dendritisches Nukleations Modell



B. 'barbed end branching' Modell



**Abbildung 1.6: Modelle der Aktin Nukleation durch den Arp2/3 Komplex.** Der durch NPFs aktivierte Arp2/3 Komplex bindet an die neu polymerisierte ATP-gebundene Region eines Filamentes. **A.** Im dendritischen Nukleations-Modell bindet er an der Seite, **B.** im ‚barbed end branching‘ Modell an das Plus-Ende eines Filamentes (nach Welch & Mullins, 2002).

Der gereinigte Arp2/3 Komplex zeigt eine geringe eigene Aktivität, kann aber zur Nukleation von Aktinpolymerisation durch viele verschiedene NPFs (‘nucleation promoting factors’) aktiviert werden und so Aktinnetzwerke organisieren. Als NPFs sind verschiedene Proteine charakterisiert worden. Diese beinhalten das ActA Protein von *L. monocytogenes* (Welch et al., 1997a), das Wiskott-Aldrich Syndrom Protein (WASP) (Winter et al., 1999), N-WASP (Rohatgi et al., 1999), ‘suppressor of cAMP-receptor’ (Scar)/WASP family verprolin homologues (WAVE) Proteine (Machesky et al., 1999), Hefe Myosin I (Evangelista et al., 2000) und andere. Obwohl alle NPFs bezüglich der Arp2/3 Aktivierung die gleiche Charakteristik haben, unterscheiden sie sich in ihrer strukturellen Organisation und den interagierenden Proteinen. Diese Diversität zeigt die Unterschiede in ‘upstream’ Signalwegen und in der Funktion der verschiedenen NPFs in den Zellen.

Das Hauptelement, das in allen NPFs konserviert ist, ist eine Arp2/3-bindende Sequenz, die als CA Region bezeichnet wird, mit einer kurzen basischen (‘connector region’ oder C) und einer sauren Region (‘acidic region’ oder A) (Welch and Mullins, 2002). Obwohl diese Region notwendig und ausreichend ist für eine Bindung an den Arp2/3 Komplex, ist sie nicht fähig eine Aktivierung *in vitro* zu bewirken (Hufner et al., 2002; Rohatgi et al., 1999).

Um den Arp2/3 Komplex zu aktivieren, muss ein NPF ein CA Element und eine zusätzliche Bindungsstelle für G-Aktin (Klasse I NPFs) oder F-Aktin (Klasse II NPFs) aufweisen. Klasse I NPFs sind ActA, WASP, N-WASP und Scar, die einen tertiären Komplex aus Arp2/3 / NPF / G-Aktin bilden, was zu einer Aktivierung des Arp2/3 Komplexes führt (Skoble et al., 2000; Welch and Mullins, 2002).

Zur Klasse II NPFs gehören z.B. Cortactin, die statt einer G-Aktin- eine F-Aktin-Bindungsstelle (FAB) enthalten, die für eine Arp2/3 Komplex Aktivierung notwendig ist (Weaver et al., 2001).

## 1.5 Prolin und Prolin-Erkennungsdomänen

Prolin ist einzigartig unter den bekannten Aminosäuren. Im Gegensatz zu anderen Aminosäuren besitzt das zyklische Prolin keine freie Aminogruppe. Infolge einer Ringbildung entsteht unter Beteiligung der alpha-Aminogruppe eine zyklische Iminogruppe. Man bezeichnet Prolin deshalb auch als ‘sekundäre Aminosäure’.

Polyprolin-Sequenzen tendieren zu einer Polyprolin (PP) II Helix mit drei Resten pro Umdrehung. Diese Helix hat eine leicht zugängliche hydrophobe Oberfläche sowie eine Wasserstoffbrücken-Seite. PP II Helices kommen in globulären Proteinen vor, wo sie im Allgemeinen löslich exponiert und amphipatisch sind (Stapley and Creamer, 1999).

Prolinreiche Sequenzen sind oft beteiligt, wenn eine schnelle Rekrutierung oder ein Austausch von verschiedenen Proteinen benötigt wird, wie z.B. in Signalkaskaden oder beim Umbau des Zytoskeletts. Einige Proteine enthalten mehrere prolinreiche Wiederholungen, die im Allgemeinen andere Funktionen haben (Kay et al., 2000).

Die Erkennung prolinreicher Sequenzen durch spezialisierte Domänen basiert auf den chemischen Unterschieden zu anderen Aminosäuren. Die Interaktion muss nicht hoch affin, sondern selektiv sein. Diese schwachen aber spezifischen Interaktionen in intrazellulären Signalwegen erklären die Fülle an Prolin-basierten Erkennungsdomänen (Zarrinpar et al., 2003).

### 1.5.1 EVH1 Domänen

Ena/VASP Homologie 1 (EVH1) Domänen sind 115 Reste-umfassende Protein-Proteininteraktions-Module und umfassen eine wichtige Familie von kleinen, nicht-katalytischen Proteininteraktions-Domänen, die spezifisch prolinreiche Sequenzen (PRS) binden. Viele EVH1 Domänen enthaltende Proteine sind mit Aktin-basierenden Strukturen assoziiert und in der Reorganisation des Aktinzytoskeletts involviert. Die Bindung ist von geringer Affinität, aber durch die Spezifität der Reste in der Protein/Peptid-Oberfläche hoch reguliert. Im Allgemeinen bindet ein kleiner Abschnitt (3-6 Reste) in der PRS des Zielproteins an die ‚Erkennungstasche‘ der Domänenoberfläche (Ball et al., 2002).

EVH1 Domänen können in zwei Klassen unterteilt werden, basierend auf den Konsensusmotiven ihrer PRS Liganden: die Ena/VASP Proteinfamilie enthält die erste Klasse, die spezifisch FPPPP-enthaltende Sequenzen erkennt (Niebuhr et al., 1997). Einzelne Experimente haben gezeigt, dass für Klasse I EVH1 Domänen ein Konsensus-Bindungsmotiv aus  $FPx\phi P$  ( $\phi$  ist eine hydrophobe AS, x ist eine beliebige AS) besteht (Ball et al., 2000). Solche Sequenzen finden sich in Säugerproteinen, wie den Fokalkontakt-Proteinen Zyxin und Vinculin und auch im ActA Protein des

intrazellulären Pathogens *Listeria monocytogenes* (Chakraborty et al., 1995; Reinhard et al., 1996). Klasse II EVH1 Domänen wurden in der Homer-Vesl Protein Familie der postsynaptischen Rezeptor-assoziierten Proteine gefunden (Kato et al., 1998). Diese erkennen einen Konsensus mit dem Motiv PPxxF.

Protein-Protein Interaktionen, die durch EVH1 Domänen vermittelt werden, können eine Rolle in der Regulation von Signaltransduktionsereignissen spielen, so ist z.B. das Ena/VASP Familien Mitglied VASP ein Substrat für cGMP/cAMP-abhängige Kinasen (Halbrugge and Walter, 1989), das Wiskott-Aldrich Syndrom Protein (WASP) interagiert direkt mit der kleinen GTPase Cdc42 (Zigmond, 2000). Ebenso sind Proteine mit EVH1 Domänen in der Reorganisation des Aktinzytoskeletts und in der Modulation der Aktindynamik und Aktin-basierender Motilität involviert (Ball et al., 2002).

### 1.5.2 SH3 Domänen

Src Homologie 3 (SH3) Domänen sind 50-70 Aminosäuren lang und kommen oft in eukaryotischen Signaltransduktions- oder Zytoskelett-Proteinen vor und vermitteln Protein-Protein Interaktionen (Bar-Sagi et al., 1993). Beispiele dafür sind die Abelson Tyrosin Kinase (Abl), Nck, Cortactin, Grb2 oder Spektrin. Dabei erkennen sie Sequenzen mit dem Konsensusmotiv PxxP, wobei x für jede beliebige Aminosäure steht. Diese Peptide liegen in einer links-gängigen Polyprolin Typ II Helix mit drei Resten pro Umdrehung vor (Pawson, 1995). Zusätzlich sind basische Aminosäuren wichtig für die Interaktion des Liganden mit der SH3 Domäne, sie bestimmen die Orientierung der Bindung.

Liganden, die basische Aminosäuren am N-Terminus der Interaktionssequenz aufweisen (Klasse I Liganden), binden üblicherweise ihre Ziel-SH3 Domäne in einer amino-carboxy Orientierung. Im Gegensatz dazu binden prolinreiche Peptide mit basischen Aminosäuren am C-Terminus des Peptids (Klasse II Liganden) an die SH3 Domäne in einer carboxy- amino Orientierung (Feng et al., 1994).

SH2/SH3 Adaptor Proteine, wie Grb2 und Nck, spielen eine wichtige Rolle in der Regulation von Tyrosinkinase-Signalwegen. Sie rekrutieren prolinreiche Effektormoleküle an Tyrosin-phosphorylierte Kinasen oder ihre Substrate. Die Entdeckung der SH2/SH3 Adaptor Proteine lieferte die Erkenntnis, wie

Signalproteine Multiproteinkomplexe im Zytosol oder an der Plasmamembran bilden können (Buday, 1999).

Neben der Konsensussequenz der oben beschriebenen SH3 Domänen gibt es auch sogenannte ‚nicht kanonische‘ SH3 Domänen, die andere Motive erkennen, wie z.B. die des ‚epidermal growth factor receptor substrate‘ Eps8, welche an ein PxxDY Motiv bindet (Mongiovi et al., 1999).

Es konnte weiter gezeigt werden, dass Phosphorylierungen von Serin/Threonin-Resten in der Erkennungssequenz zu einer Inhibierung der SH3 Domänen-Interaktion führen können, was einen zusätzlichen Regulationsmechanismus darstellt (Comer et al., 1998).

### **1.5.3 WW Domänen**

WW Domänen sind kleine globuläre Module, die aus 38-40 Aminosäuren bestehen. Der Name leitet sich von zwei konservierten Tryptophan (W) Resten ab, die durch 20-22 AS getrennt sind und eine wichtige Rolle in der Struktur und der Funktion der Domäne spielen (Hu et al., 2004). WW Domänen werden in zwei grosse und zwei kleinere Gruppen unterteilt: eine grosse Gruppe (Gruppe I) bindet Polypeptide mit einem minimalen Konsensusmotiv PPxY, während Gruppe II Liganden mit einem PPLP Motiv innerhalb einer langen Prolin-Anordnung binden. Die Gruppe III der WW Domänen bindet selektiv an Polyprolin-Motive, die von einem Arginin (R) oder Lysin (K) flankiert werden, Gruppe IV WW Domänen binden an kurze Sequenzen mit Phospho-Serin oder Phospho-Threonin gefolgt von Prolinen, in Abhängigkeit der Phosphorylierung (Sudol and Hunter, 2000). Daher kann man WW Domänen in ihrer Funktion auch als Phosphorylierungs-abhängige SH3 Domänen betrachten (Macias et al., 2002).

### **1.5.4 Profilin**

Profilin ist ein kleines Aktin-bindendes Protein (15kDa), das in allen eukaryotischen Zellen vorkommt. Profiline regulieren die Dynamik der Aktinpolymerisation und können an Aktinmonomere binden (G-Aktin) (Schluter et al., 1997). Diese werden an wachsende Filamente gelenkt, um so die Aktinpolymerisation zu fördern (Wittke,

2004). Profilin hat ausserdem zwei andere Bindungsdomänen: eine für Phosphoinositide (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>) und eine für Poly-L-Prolin.

Innerhalb seiner Struktur exponiert Profilin, wie SH3, WW und EVH1 Domänen, aromatische und hydrophobe Reste, die eine Oberfläche formen, die prolinreiche Liganden bindet (Sudol, 1998). Profilin benötigt für eine Bindung 6-8 Proline, um eine hohe Affinität zu erreichen. Einige dieser Motive sind durch Leucine flankiert, was zu der Vermutung führte, dass einige prolinreiche Liganden mit Profilin und SH3 oder WW Domänen mit gleicher Affinität interagieren. Es wurde weiterhin spekuliert, dass Profilin eine Verbindung zwischen Signalwegen und der Umgestaltung des Aktinzytoskeletts darstellt (Sohn and Goldschmidt-Clermont, 1994).

## 1.6 Die Ena/VASP Protein Familie

### *Struktur und Bindungspartner*

Proteine der Ena/VASP Familie sind wichtige Regulatoren der Aktindynamik und der Zellbewegung in einer Vielzahl von Organismen und Zelltypen. In Säugern gibt es drei Proteine, die zur Ena/VASP Familie gehören: das Vasodilator-stimulierte Phosphoprotein (VASP), mammalian Enabled (Mena) und das Ena/VASP like Protein (Evl). VASP wurde als erstes Mitglied dieser Proteinfamilie in Blutplättchen identifiziert (Halbrugge and Walter, 1989). Das *Drosophila* Enabled (Ena) Protein wurde als Mitglied dieser Proteinfamilie in einer genetischen Suche als dominanter Suppressor von *Drosophila* Abelson Tyrosin Kinase (D-Abl) Mutanten entdeckt (Gertler et al., 1990). Ena/VASP Proteine lokalisieren innerhalb der Zellen in Regionen mit dynamischer Aktinreorganisation, wie der lamellipodialen Spitze und den Enden von Filopodien und an Zell-Matrix Kontaktstellen, wie Fokalkontakten (Gertler et al., 1996; Lambrechts et al., 2000; Rottner et al., 1999a). Ena/VASP Proteine binden direkt an F- und G-Aktin und dem Aktinmonomer-Bindeprotein Profilin, was darauf hindeutet, dass sie direkt die Aktindynamik regulieren können (Bachmann et al., 1999; Huttelmaier et al., 1999).

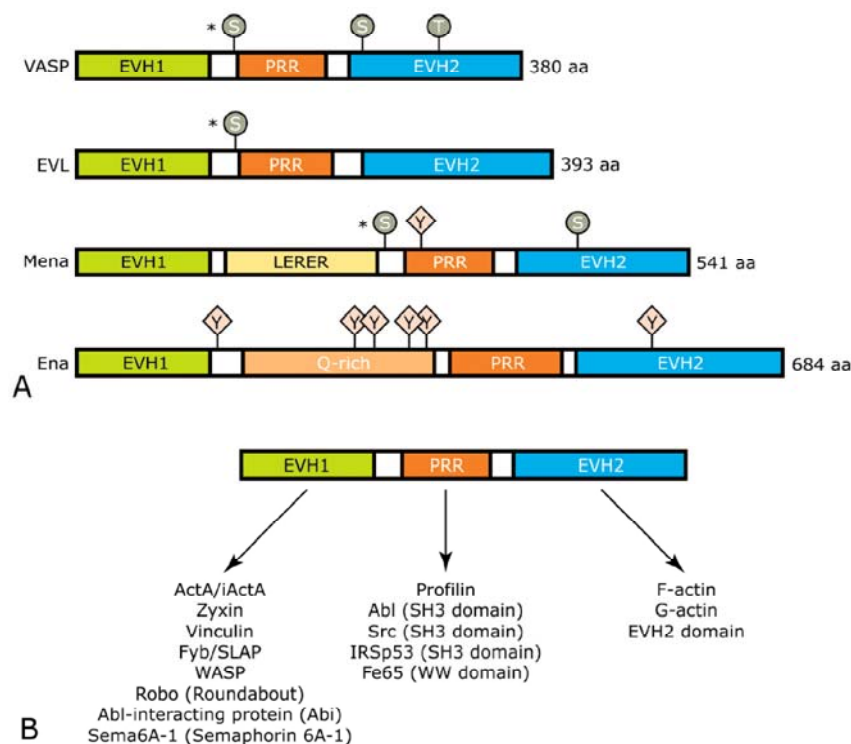
Wie in Abbildung 1.7 dargestellt weisen alle Proteine dieser Familie die gleiche Domänenstruktur auf, eine N-terminale Ena/VASP Homologie 1 (EVH1) Domäne (siehe Kapitel 1.5.1), eine zentrale prolinreiche Domäne und eine C-terminale EVH2 Domäne. Über die EVH1 Domäne binden Ena/VASP Proteine Proteine mit



prolinreichen Sequenzen, wie Vinculin, Zyxin, Fyb/SLAP oder ActA von *Listeria monocytogenes* (Krause et al., 2003).

Die prolinreiche Domäne bindet innerhalb der Mitglieder der Proteinfamilie unterschiedliche Proteine mit SH3 Domänen wie Abl, Lyn, Src (Lambrechts et al., 2000) oder Irs53 (Krugmann et al., 2001) und WW Domänen enthaltende Proteine wie FE65 (Ermekova et al., 1997). Alle Ena/VASP Proteine enthalten prolinreiche Bindungsstellen für das G-Aktin bindende Protein Profilin, dessen Bindung unabhängig von ihrem Phosphorylierungszustand ist (Gertler et al., 1996).

Die EVH2 Domäne ist für die F- und G-Aktin Bindung verantwortlich und enthält ein ‚coiled-coil‘ Motiv, welches zur Di- bzw. Tetramerisierung führt. Im Allgemeinen scheinen Protein-Protein Interaktionen von Ena/VASP Proteinen verstärkt oder stabilisiert zu werden, wenn eine Oligomerisierung der Ena/VASP Proteine vorliegt (Bachmann et al., 1999).



**Abbildung 1.7: Die Familie der Ena/VASP Proteine und ihre Bindungspartner.** (A) Domänenorganisation der Ena/VASP Proteine. EVH, Ena/VASP Homologie Domäne; PRR, prolinreiche Region; Q-rich, Glutaminreiche Region; LERER, Region mit LERER Wiederholungen. Serin und Threonin Phosphorylierungen sind durch grüne Kreise markiert. Die konservierte Serin-Phosphorylierungsstelle ist mit einem Stern gekennzeichnet. Tyrosin-Phosphorylierungen sind als Rauten angegeben. (B) Hauptbindungspartner der EVH1, EVH2 und PRR Domänen in Ena/VASP Proteinen (nach Sechi and Wehland, 2004).

### *Funktion und Regulation*

Ena/VASP Proteine lokalisieren in Fokalen Adhäsionsstrukturen (Reinhard et al., 1995) und an der Spitze von Lamellipodien und Filopodien (Rottner et al., 1999a; Svitkina et al., 2003). Diese Lokalisationscharakteristika unterstreichen die Vielseitigkeit der Ena/VASP Proteine in ihren Interaktionen mit verschiedenen Partnern und spiegeln die komplexe Funktion der Ena/VASP Proteine in der Zellbewegung wieder (Reinhard et al., 2001).

Hinweise auf die Rolle der Ena/VASP Proteine in der Zellbewegung kamen von Analysen des Effektes von VASP Deletionen/Überexpressionen im motilen Verhalten lebender Zellen (Bear et al., 2000; Garcia Arguinzonis et al., 2002; Rottner et al., 1999a) und vom Aktin-basierten Vorschub von *Listeria* (Chakraborty et al., 1995; Laurent et al., 1999; Loisel et al., 1999). Aktin-basierte Bewegung wird durch direkte Aktivierung des Arp2/3 Komplexes durch das ActA Protein (in *Listeria*) oder durch die Proteine der Wiskott-Aldrich Syndrom Protein (WASP/Scar) Familie (in Lamellipodien und Filopodien) vermittelt, welche die Produktion neuer Filamente durch ‚barbed end‘ Verzweigung katalysieren und so einen Vorschub bzw. protrusive Kräfte erzeugen (Pantaloni et al., 2001).

Die Funktionen von Ena/VASP Proteinen werden kontrovers diskutiert. Ena/VASP Proteine binden direkt an monomeres und filamentöses Aktin (Bachmann et al., 1999) und fördern *in vitro* die Nukleation von Aktinfilamenten (Bachmann et al., 1999; Huttelmaier et al., 1999; Lambrechts et al., 2000). Die Menge an VASP an der lamellipodialen Spitze korreliert positiv mit der Rate der Ausbreitung des Lamellipodiums (Rottner et al., 1999a). Die Abwesenheit von VASP resultiert in verringerter Motilität der Zellen (Garcia Arguinzonis et al., 2002). Andererseits wird beschrieben, dass Zellen, denen Mena und VASP fehlen, eine erhöhte Motilität zeigen und die Lamellipodien ein höher verzweigtes Aktinnetzwerk mit kürzeren und mehr verzweigten Filamenten zeigen, während Lamellipodien nach Überexpression von Ena/VASP längere, weniger verzweigte Aktinfilamente enthalten (Bear and al., 2002). Um diese Daten in Einklang zu bringen, wurde postuliert, dass VASP das ‚barbed end capping‘ von Filamenten inhibiert, was zu einer augenblicklichen Erhöhung der Protrusionsrate führt (Bear and al., 2002). Da dieses Modell in nachfolgenden Studien jedoch nicht bestätigt werden konnte (Boujemaa-Paterski et

al., 2001), ist der molekulare Mechanismus der Ena/VASP Funktionen weiterhin Gegenstand intensiver Forschung.

## 1.7 Grb-Protein Familie der Signal-Adaptoren

Die Familie der Wachstumsfaktor Rezeptor Bindeproteine (,growth factor receptor bound', Grb) umfasst die Mitglieder Grb7, Grb10 und Grb14, die alle unterschiedliche Splice-Varianten aufweisen. Wie andere Adaptormoleküle vermittelt die Familie der Grb-Proteine die Kopplung von verschiedenen Zelloberflächen-Rezeptoren mit spezifischen ,downstream' Signalwegen. Die Familienmitglieder Grb7/10/14 zeigen signifikante Sequenzhomologien und eine konservierte molekulare Architektur, wie in Abbildung 1.8 dargestellt. Diese beinhaltet eine prolinreiche N-terminale Region (PR), eine zentrale GM (Grb7/10/14 und MIG) Region, die eine Ras-Assoziations (RA)-Domäne (gelb) und eine Pleckstrin-Homologie (PH) Domäne (grün) aufweist und eine C-terminale SH2 Domäne (rot).

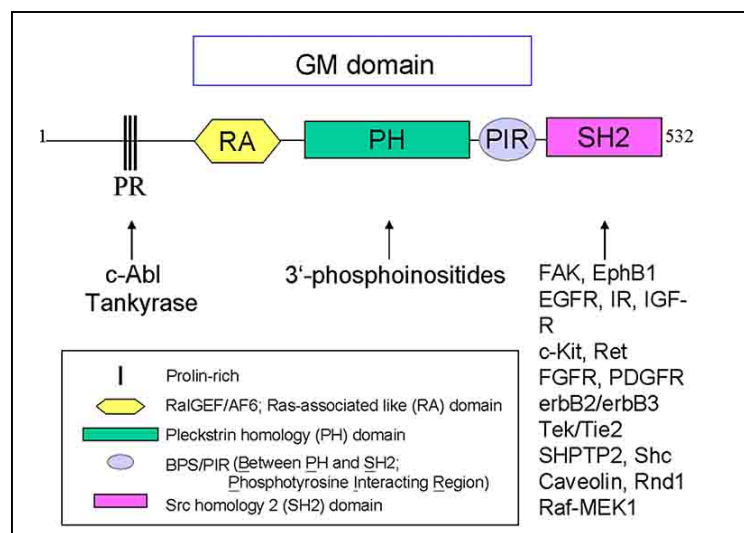
Für die prolinreiche Region in Grb7 konnten bisher keine Interaktionspartner identifiziert werden, die prolinreiche Region in Grb10 bindet an die SH3 Domäne von c-Abl *in vitro*, interagiert aber nicht mit den SH3 Domänen von Grb2, PI3K oder Fyn (Frantz et al., 1997).

Die zentrale GM Region umfasst ca. 300 AS, die eine hohe Sequenzhomologie (ungefähr 50 % AS Identität) zwischen den Mitgliedern der Grb7/10/14-Familie und dem *C.elegans* Protein MIG-10 aufweist (Manser et al., 1997). Das MIG-10 Protein spielt eine Rolle in der Migration von neuronalen Zellen während der Embryonalentwicklung des Nematoden (Manser and Wood, 1990). Diese Sequenzhomologien weisen darauf hin, dass Grb7 oder andere Mitglieder der Familie eine Rolle in der Regulation der Zellbewegung in Säugern spielen. In der Tat wurde eine Interaktion zwischen Grb7 und der Fokalen Adhäsionskinase (FAK) identifiziert, und es konnte gezeigt werden, dass diese Bindung für die Vermittlung der FAK-regulierten Zellmigration kritisch ist (Han and Guan, 1999; Han et al., 2000). Eine Überexpression von Grb7 in NIH3T3 Zellen verstärkte die Migration der Zellen auf Fibronectin, wohingegen die SH2 Domäne alleine zu einer Inhibierung der Zellbewegung führte (Han and Guan, 1999).

Für die PH Domäne in Grb7 konnte eine Bindung an spezifische Phosphoinositide gezeigt werden (Shen et al., 2002), für die PH Domäne von Grb10 ist keine Bindung

an Phosphoinositide bekannt (Lim et al., 2004). Für die RA Domäne konnten noch keine Grb/GTPasen Interaktionen gezeigt werden (Leavey et al., 1998).

Die SH2 Domäne der Grb7/10/14-Proteine spielt eine wichtige Rolle in der Interaktion zwischen Grb-Familienmitgliedern und Rezeptor Tyrosin-Kinasen und anderen Tyrosin-phosphorylierten Signalmolekülen. Obwohl eine hohe Aminosäureidentität zwischen den Grb-Proteinen in der SH2 Domäne vorliegt, haben die Familienmitglieder unterschiedliche Präferenzen für ihre Bindungspartner. So bindet Grb7 über seine SH2 Domäne stark an den Rezeptor erbB2 (Stein et al., 1994), Grb10 und Grb14 assoziieren schwach bzw. nicht mit erbB2 (Janes et al., 1997). Dies deutet darauf hin, dass die Grb-Familienmitglieder mit verschiedenen spezifischen funktionellen Partnern interagieren (Han et al., 2001).



**Abbildung 1.8: Domänenstruktur und Bindungspartner der Grb-Protein Familie.**

Dargestellt ist die Domänenstruktur der Grb-Proteine und nachgewiesene Interaktionen mit Liganden (nach Shen, 2004).

## 1.8 Ziel der Dissertation

Ziel dieser Arbeit war es, einen neuen Liganden der Ena/VASP Proteine an der lamellipodialen Spitze zu charakterisieren und dessen Funktion zu analysieren.

Einige Bindungspartner von Ena/VASP Proteinen in Fokalkontakten, wie Zyxin und Vinculin, sind gut charakterisiert, fehlen aber an der lamellipodialen Spitze (Rottner et al., 2001). Bis vor kurzem waren keine Bindungspartner der Ena/VASP Proteine an der Spitze von Lamellipodien bekannt. Deshalb wurde in unserer Arbeitsgruppe nach neuen Interaktionspartnern in diesem Kompartiment gesucht.

Dazu wurde eine HeLa cDNA Bibliothek mit einem Antikörper durchsucht, der das Konsensusmotiv der EVH1 Domäne D/E-FPPPP-XD/E der Ena/VASP Proteine erkennt (Dissertation B. Behrendt). Bei dieser Suche wurden mehrere kreuzreaktive Klone identifiziert, darunter der Rho-GEF LARG (Acc. No.: NP 056128), das ERM Familienmitglied Radixin (Acc. No.: NP\_002897) und ein neues Protein mit Sequenzähnlichkeit zu dem uncharakterisierten murinen Protein prp48 (AF020313, für prolinreiches Protein aus Klon Nummer 48). Ein Fragment des murinen prp48 wurde früher zusammen mit Mena in einer Suche für potentielle Bindungspartner der WW Domäne von FE65 identifiziert (Ermekova et al., 1997). Dieses Protein wurde aufgrund seiner potentiellen Bindung an Ena/VASP Proteine PREL1 (**P**roline **R**ich **E**VH1 **L**igand 1) genannt und im Rahmen dieser Arbeit im Detail auf Bindungspartner und seine Funktion innerhalb der Zellen untersucht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Biolabs, Biorad, Boehringer Mannheim, Difco, Fluka, Gibco BRL, Höchst, Life Technologies, Merck, Millipore, New England Biolabs, Pharmacia, Promega, Qiagen, Riedel de Haen und Sigma bezogen. Alle Substanzen haben, sofern nicht anders angegeben, die Reinheitsgrade 'p.a.' bzw. 'reinst'. Alle Lösungen wurden in deionisiertem Wasser angesetzt, welches mit einem Milli-Q-System (Millipore) aufbereitet wurde.

### 2.2 Mikrobiologische Kulturen

#### *Escherichia coli*

Verwendete *Escherichia coli* Stämme: BL21 und BL21 CodonPlus (Stratagene)  
TG2 (Stratagene)  
XL1 blue (Stratagene)

Medien:

LB-Medium (Luria Bertani broth):	Bacto-Trypton	10 g/l
	Bacto- Hefeextrakt	5 g/l
	NaCl	7 g/l

LB-Agarplatten: 16 g Bacto-Agar wurden in 1 l LB-Medium eingewogen, aufgeköcht und handwarm in Petrischalen gegossen.

Nach Abkühlen des autoklavierten Agarmediums auf ca. 45°C wurden je nach Bedarf Antibiotika-Stammlösungen hinzugegeben (Ampicillin 100µg/ml oder Kanamycin 25 µg/ml) und das Medium in Petrischalen gegossen.

SOB-Medium :	Bacto-Trypton	20	g/l
	Bacto-Hefeextrakt	5	g/l
	NaCl	10	mM
	KCl	2,5	mM
	MgCl <sub>2</sub>	10	mM
	MgSO <sub>4</sub>	10	mM

SOC-Medium :	SOB-Medium		
	MgCl <sub>2</sub>	10	mM
	MgSO <sub>4</sub>	10	mM
	Glucose	20	mM

## 2.3 Kulturbedingungen

Zur Anzucht von *E.coli* wurden je 5 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und in einem Schüttelinkubator bei 180-200 rpm über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Vorkultur wurde in einer 1:50-Verdünnung zum benötigten Volumen LB-Medium gegeben und bis zu der gewünschten optischen Dichte im Schüttelinkubator (180 rpm, 37°C) inkubiert.

Die langfristige Lagerung erfolgte als Glycerinkultur bei -70°C. Dazu wurden 0,75 ml Kultur, welche sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden (2 ml Medium beimpfen, 6-8 h bei 37°C inkubieren), mit 0,25 ml Glycerin (87 %) vermischt.

## 2.4 Zellkultur

Alle Medien und Lösungen für die Zellkultur wurden sterilfiltriert (Steritop, Millipore).

### 2.4.1 Verwendete Kultur-Medien und Lösungen

**DMEM** (Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium), Gibco

**Observationsmedium** F12 HAM (Sigma): 25 mM HEPES+ NaHCO<sub>3</sub> + 0,146 g/l L-Glutamin

Lösungen:

PBS (Phosphate-Buffered- Saline):	2,6 mM	KCl
	1,5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	140 mM	NaCl
	8,3 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	pH 7,3	

Penicillin-Streptomycin-Lösung (P/S) :	Penicillin	5000 U/ml
	Streptomycin	5000 U/ml

Die P/S-Lösung (Gibco) wurde gegebenenfalls als Kontaminationsschutz den Medien 1:100 zugesetzt.

100 x Nicht-essentielle Aminosäuren, Gibco (Endkonzentration 1 x )

100 mM Natrium-Pyruvat, Gibco (Endkonzentration 1 mM)

*Phorbol*

Tetradecanoylphorbol 13-Acetat (TPA, Sigma), 1mg/ml Stocklsg. (Endkonzentration 1µg/ml)

Phorbol 12,13-dibutyrat (PDBu, Sigma), 1mM Stocklsg. (Endkonzentration 1µM)

### 2.4.2 Verwendete Zelllinien und Vollmedien

SW3T3 (Embryofibroblasten-Zelllinie Maus (swiss albino), ATCC CCL-92), kultiviert in DMEM (Gibco) mit 4,5 g/l Glucose + 10% FCS (v/v) (Sigma) + 2 mM Glutamin (Gibco) + Nicht-essentielle Aminosäuren (Gibco, 1:100) + Natrium-Pyruvat (Gibco, 1:100) + P/S (1:100)

NIH3T3 (Embryofibroblasten-Zelllinie Maus, ATCC CRL-1658), Kulturmedium wie SW 3T3

B16F1 (Melanom-Zelllinie Maus, ATCC CRL-6323), kultiviert in DMEM (Gibco) mit 4,5 g/l Glucose + 10 % FCS (v/v) (PAA, Linz, Österreich) + 2 mM Glutamin (Gibco) + P/S (1:100)

A7r5 (Glattmuskelzellen Ratte, ATCC CLR-1444), kultiviert in DMEM (Gibco) mit 1 g/l Glucose + 10 % FCS (PAA Gold, Linz, Österreich) + 2mM Glutamin + P/S (1:100)

Rat2 (Embryofibroblasten-Zelllinie Ratte, ATCC CLR-1764), Kulturmedium wie A7r5

T Zellen aus DO11.10 Maus Stamm: T-Zellrezeptor-transgener Stamm,  
B Zellen aus Balb/c Maus Stamm (Harlan-Winkelmann GmbH, Borcheln, Deutschland)  
(Frisch isoliert von B. Dornbach, GBF Braunschweig)

#### *Zellextrakte:*

Neben den oben aufgeführten Zelllinien wurde auch von anderen Zelllinien Zellextrakte verwendet:

REF (Embryonale Fibroblasten, Ratte)

Jurkat (T-Lymphozyten)

Raw264.1 (Makrophagen Maus, ATCC TIB-71)

DMBM (Makrophagen Mensch)



## 2.5 Molekularbiologische Methoden

### 2.5.1 Plasmide

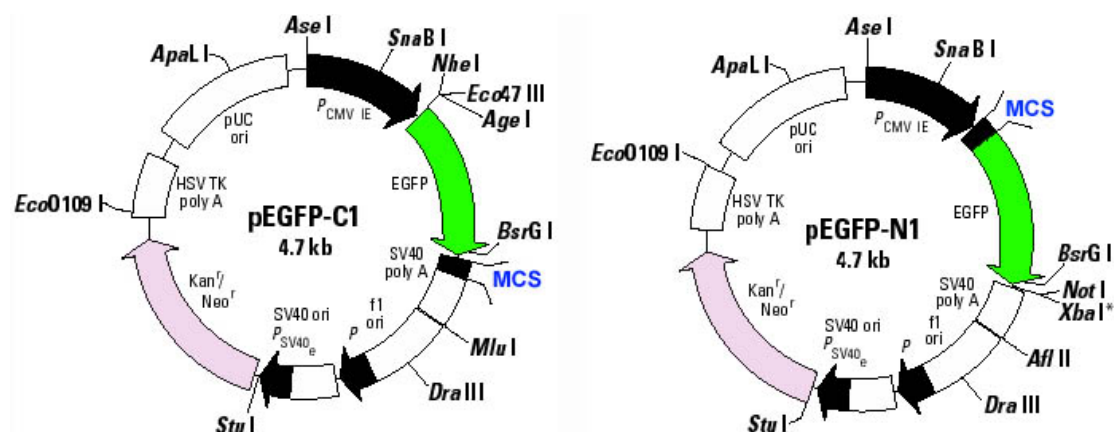
#### *pCR2.1-TOPO (Invitrogen)*

pCR-Plasmide als Klonierungsvektoren wurden bei der direkten Klonierung von PCR-Produkten angewendet. Das PCR-Produkt kann dabei ohne Modifikationen in den Vektor eingefügt und mit universellen Primern sequenziert werden.

#### *pEGFP-N1 / N3 / C1 / C2 (Clontech)*

pEGFP-Plasmide sind Expressionsvektoren, die zur Fusion eines zu untersuchenden Gens oder eines Teilstückes mit EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) dienen. Das durch Mutationen veränderte Markenprodukt EGFP (Clontech) basiert auf einem ursprünglich aus der Qualle isolierten Proteins, welches bei Anregung mit bläulichem Licht grün fluoresziert. Es kann daher als Lokalisationsmarker in lebenden Zellen und Geweben eingesetzt werden. Die zu untersuchende Sequenz kann sowohl N- als auch C-terminal an das EGFP fusioniert werden (siehe Abb. 2.1).

Die in dieser Arbeit verwendeten **GFP-Fusionsproteine** sind in Tabelle 3 zusammengefasst.



**Abbildung 2.1 Plasmid-Karten der pEGFP-C1 und -N1 Fusionsvektoren.** Es sind die wichtigsten Abschnitte wie die Multiple cloning site (MCS), Antibiotikaresistenz, Promotor und Transkriptions-/Replikationsstartstellen (Ori's) dargestellt. Beim Vektor pEGFP-C1 befindet sich die MCS C-terminal, beim pEGFP-N1 N-terminal vom EGFP. (nach Living Colors™ GFP Application Notes, Clontech Laboratories Ltd.).

#### *pGEX –6P-1/2/3 und pGEX-2TK (Amersham)*

Die pGEX – Plasmide sind für eine hohe intrazelluläre Expression von Proteinen oder Proteinfragmenten als Fusion mit *Schistosoma japonicum* GST konstruiert worden. Mit dem

Fusionsplasmid werden dann BL21 (CodonPlus) Bakterien transformiert. Bei BL21 handelt es sich um einen Protease-defizienten Stamm, der besonders für die Expression klonierter Genprodukte, die während der Reinigung empfindlich gegenüber Hydrolyse sind, geeignet ist. Außerdem ist dieser Stamm optimiert für die Expression eukaryotischer Genprodukte.

Die Fusionsproteine der pGEX-6P – Plasmide stehen unter der Kontrolle des lac – Promotors, der durch das Lactose-Analogon Isopropyl-β-D-thiogalaktosid (IPTG) induziert wird. Induzierte Kulturen können für mehrere Stunden exprimieren, wonach die Zellen geerntet und dann lysiert werden.

GST kommt natürlicherweise als 27 kDa Protein vor und wird in *E.coli* mit voller enzymatischer Aktivität exprimiert. Fusionproteine, die die komplette Aminosäuresequenz der GST besitzen, zeigen ebenfalls die enzymatische Aktivität der GST.

Die in dieser Arbeit verwendeten **GST-Fusionsproteine** sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

## 2.5.2 Oligonukleotide und Expressed sequence tags (EST) Klone

Die Oligonukleotide sind in 5'→3'-Richtung angegeben und Restriktionsschnittstellen sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

PREL1 PR-N:	for	ATGACACAAGAACCCTTAACC
	rev	TCTGTGTCTCTTGTCCAGTC
PREL1 RA-Domäne:	for BamHI	AGA↓GGA TCC↓TCTAAAGAAGAAGAAGAAGC
	rev XhoI	GCT↓CTCGAG↓CCAAGTAGAAATTCTGAGG
PREL1 PH-Domäne:	for BamHI	AGA↓GGATCC↓GAGGAAAGTTTCTGTGG
	rev Sall	AGA↓GTCGAC↓GCCACAGCCCGCTG
PREL1 Tandem:	for BamHI	AGA↓GGATCC↓TCTAAAGAAGAAGAAGAAGC
	rev Sall	AGA↓GTC GAC↓GCC ACA GCC CGC TG
Rap1A:	for BamHI	GAG↓GGATCC↓ATGCGTGAGTACAAGCTAG
	rev EcoRI	GAG↓GAATTC↓GTCTAGAGCAGCAAACATG
Primer für 'site directed mutagenesis'		
Rap1AV12:	for	CTTGGTTCAGTAGGCGTGGGG
	rev	CCCCACGCCTACTGAACCAAG

Sequenzierprimer ‚TOPO‘:

M13 Reverse	CAGGAAACAGCTATGAC
M13 (-20) Forward	GTAAAACGACGGCCAG

Sequenzierprimer ‚pEGFP‘:

pEGFP-N1-5SQ2	GGACACGCTGAACTTGTGG
pEGFP-C2-5SQ	GGTCCTGCTGGAGTTCGT

*EST- Klon (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung (RZPD), Berlin):*

fl PREL1: Maus, bp 1-2007 coding sequence, IMAGE ID 5009113, GI:14500382

PREL1 C-Terminus: Human, bp 1271-2423 (enthält Stop codon inkl. 3'UTR und poly-A);  
IMAGE ID 4850912, GI: 14067421

### 2.5.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine automatisierte Methode zur enzymatischen Amplifizierung eines DNA-Abschnittes zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge binden. Dabei gelingt der Nachweis kleinster Mengen spezifischer DNA-Sequenzen. Die PCR-Reaktion besteht aus einem wiederholten Zyklus von DNA-Denaturierung, Primer-Hybridisierung und Primer-Extension. Im ersten Schritt wird die DNA bei einer Temperatur von 94°C denaturiert. Anschließend binden die im Überschuss zugegebenen Primer bei einer Temperatur zwischen 50°C und 65°C an die DNA-Stränge. Bei der Extension bindet dann eine hitzestabile DNA-Polymerase bei einer Temperatur von 72°C an die 3'-OH-Primer-Enden und synthetisiert komplementäre DNA-Sequenzen. Die Anzahl der DNA-Moleküle verdoppelt sich nach jedem Zyklus. Die spezifische DNA-Sequenz kann sich um den Faktor  $10^5$ - $10^7$  bei 20-30 wiederholten Zyklen vermehren.

Bei der Auswahl der Primer ist zu beachten, dass die Differenz der Schmelztemperatur zwischen den eingesetzten Primern nicht größer als 2°C ist und bei ca. 60°C liegt. Die Anzahl der Nukleotide sollte 20-30 betragen und der GC-Gehalt bei ca. 50% liegen. Um eine stabile Bindung zwischen DNA und Primer zu ermöglichen, sollten die beiden endständigen Nukleotide Cytosin oder Guanin sein, da diese im Gegensatz zu Adenin und Thymin drei Wasserstoff-Brückenbindungen ausbilden.

Allgemeiner PCR-Ansatz :	DNA	0,1- 0,2 µg
	dNTP-Mix (Stratagene)	0,2 mM
	Oligonukleotid-Primer	10 pM
	10 x cloned Pfu-Puffer (Stratagene)	5 µl
	PfuTurbo-Polymerase (Stratagene)	1,25 U
	H <sub>2</sub> O	ad 50 µl

Gerät : PTC-0200 DNA Engine, Biozym (MJ Research, Massachusetts)

#### 2.5.4 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen lassen sich doppelsträngige DNA-Moleküle Sequenz-spezifisch spalten. In Abhängigkeit von der erkannten und geschnittenen DNA-Sequenz entstehen dabei glatte Enden ('blunt ends') oder durch einen asymmetrischen Schnitt Enden mit überstehender einzelsträngiger DNA ('sticky ends'). Mit Restriktionsenzymen kann man DNA-Moleküle in reproduzierbare Fragmente zerlegen, die dann z.B. durch Agarosegelelektrophorese analysiert werden können (siehe Kapitel 2.5.5).

Restriktionsendonukleasen binden enzyspezifisch an meist palindromartig angeordneten Erkennungssequenzen und schneiden innerhalb dieser Erkennungssequenz die DNA durch Spaltung von zwei Phosphodiester-Bindungen.

Es wurden Restriktionsendonukleasen der Firma Boehringer, MBI Fermentas oder New England Biolabs mit den jeweils empfohlenen 10x Puffern verwendet.

Restriktionsansatz:	DNA	
	10x Restriktionspuffer	(Endkonzentration 1x)
	Restriktionsenzym	6-30U (max. 1/10 Volumen)
	MilliQ-H <sub>2</sub> O	ad 15-100 µl

Der Ansatz wurde für 1 h oder über Nacht bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von DNA-Stopp-Puffer oder Aufreinigung gestoppt. Das im Stopp-Puffer enthaltene EDTA chelatiert für die Enzyme notwendige zweiwertig-positiv geladene Ionen, so dass die Enzyme nicht mehr funktionsfähig sind.

#### 2.5.5 Agarosegelelektrophorese

Nukleinsäuren lassen sich entsprechend ihrer Größe in einem elektrischen Feld in einer Gelmatrix auftrennen. Dabei wandern die negativ geladenen Nukleinsäuren mit einer Geschwindigkeit, die umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Größe ist. Weitere Faktoren, die die Geschwindigkeit der DNA/RNA -Wanderung bestimmen, sind die Stromstärke des elektrischen Feldes, die Pufferbedingungen und die Agarose-Konzentration. Das Verfahren wird sowohl zu analytischen als auch zu präparativen Zwecken eingesetzt. Um

die Nukleinsäuren im Gel sichtbar zu machen, kann der Farbstoff Ethidiumbromid zugegeben werden, der nach Interkalation in die DNA/RNA-Moleküle unter UV-Licht rötlich fluoresziert. Die Größen der Banden können durch den Vergleich mit einem entsprechenden Marker festgestellt werden.

Für DNA –Gele wurde zu 1x TAE-Puffer Sea Kem GTG Agarose (FMC Bioproducts) bis zu einer Endkonzentration von 1-2 % gegeben und in der Mikrowelle aufgeköcht, bis sich die Agarose vollständig löst. Nach Abkühlen auf ca. 50°C wurde Ethidiumbromid bis zu einer Endkonzentration von 0,1µg/ml zugegeben und die Lösung in einen Elektrophoreseschlitten mit Kamm gegossen. Bei RNA-Gelen muss eine Kontamination mit RNAsen ausgeschlossen werden (Inkubation der Gelträger und Kämme mit 0,2M NaOH, 15min.). RNA-Gele wurden in 10mM Phosphatpuffer (RNase-frei) angesetzt, in dem dann auch der Gellauf stattfand. Auf die Zugabe von EtBr wurde verzichtet.

Nach Erkalten der Lösung zu einem Gel, wurde dieses in eine Gelkammer gelegt und mit 1x Puffer überschichtet. Der Kamm wurde entfernt und die Proben mit 1/5 Volumen 5x DNA-Stopp-Puffer bzw. RNA-Loading Buffer versetzt und in die Taschen pipettiert. Zusätzlich wurde ein Standard- Marker zur Bestimmung der Fragmentgrößen mit aufgetragen. Nach dem Anlegen des elektrischen Feldes wandert die negativ geladene Nukleinsäure auf den positiven Pol zu. Die Elektrophorese erfolgt bei 50-80 V. Nach ausreichender Trennung wurde das Ergebnis im Falle der DNA-Fragmente photographisch festgehalten.

Da der Phosphatpuffer für die RNA-Elektrophorese keine ausreichenden Puffereigenschaften besitzt, muss der Laufpuffer während der Auftrennung umgewälzt werden. Nach der Elektrophorese der RNA erfolgte der Transfer auf eine positiv geladene Membran (siehe 2.5.17).

5x DNA-STOPP-Puffer:	Ficoll	15% (v/v)
	EDTA	50 mM
	SDS	0,4% (w/v)
	50 x TAE-Puffer	20 µl
	Bromphenolblau	0,05% (w/v)
	Xylencyanol FF	0,05% (w/v)
50x TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA):	Tris-Base	2 M (pH 7,5)
	Na-Acetat	1 M
	EDTA	50 mM

Laufpuffer für RNA-Gele: 10mM Na-Phosphat, pH 7,0 in DEPC-H<sub>2</sub>O

DNA-Marker: Smart-ladder (Eurogentech)

RNA-Marker: RNA-Längenstandard I (Roche), Digoxigenin-markiert (0,3-6,9 kb)

Geräte : Gelkammer (Gibco BRL) und Power-Supply (Biometra)

### 2.5.6 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen :

Der PCR-Ansatz oder Restriktionsansatz wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, die entsprechende Bande aus dem Gel in einem möglichst kleinen Volumen ausgeschnitten und das DNA-Fragment mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) aus dem Gel eluiert und aufgereinigt.

Aufreinigung von PCR-Produkten :

Um PCR-Ansätze von Reaktionsrückständen und Primern zu reinigen, wurde das „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen) verwendet.

### 2.5.7 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Eine Religation eines durch Restriktionsenzyme geschnittenen Vektors wird durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase verhindert. Das Enzym spaltet die Phosphatgruppe an den 5'-Enden des Vektors ab. Nur der Einbau eines phosphorylierten 'Inserts' ermöglicht dann das Schließen des Vektors.

Enzym und Puffer : Alkalische Phosphatase (Boehringer)  
10x Dephosphorylierungspuffer :  
Tris-HCl, pH 8,5                      500 mM  
EDTA                                      1    mM

Reaktionsansatz :    Vektor-DNA                                      x µg (Menge ist variierbar)  
                              10 x Dephosphorylierungspuffer    10 µl  
                              Alkalische Phosphatase                      1    µl  
                              H<sub>2</sub>O    ad 100 µl

Der Ansatz wurde für 10 min bei 37°C und 10min. bei 42°C inkubiert.

Anschließend wurde die dephosphorylierte DNA mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ aufgereinigt.

### 2.5.8 Ligation von DNA

Bei der Ligation wird der dephosphorylierte Vektor mit einem DNA-Fragment durch eine T4-DNA-Ligase verbunden. Die Ligase katalysiert dabei die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen den benachbarten 3'-OH- und 5'-Phosphat-Enden. Der Vektor sowie das zu inserierende DNA-Fragment wurden vorher mit den selben oder mit kompatiblen Restriktionsendonukleasen geschnitten. Die „Insert“-DNA wird bei kleinen Fragmenten im Überschuß gegenüber der Vektor-DNA zugegeben.

Ligationsansatz:	Vektor-DNA	10-100 ng
	'Insert'-DNA	3-4 x Menge der Vektor-DNA
	10 x Ligase-Puffer	1,5 µl (Boehringer)
	T4-DNA-Ligase	1 U (Boehringer)
	H <sub>2</sub> O	ad 10 µl

Die Inkubation erfolgte in Eiswasser, das sich über Nacht bis auf RT erwärmte und somit einen Temperaturgradienten durchlief, anschließend wurde direkt in *E.coli* transformiert.

### 2.5.9 Herstellung kompetenter *Escherichia coli*

Vor der Transformation müssen die Bakterienzellen in einen für die Aufnahme von Plasmid-DNA ‚kompetenten‘ Zustand überführt werden. Hierbei wird die Bakterienoberfläche derart verändert, dass Fremd-DNA daran binden kann. Die Kompetenz wird bei *E.coli* durch Inkubation der Bakterien aus der frühen log-Phase in CaCl<sub>2</sub> erreicht.

Eine Übernachtskultur von *E. coli* TG2 bzw. BL21 wurde in 100 ml SOB-Medium 1:50 verdünnt, bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,5 inkubiert und durch zentrifugieren geerntet (5000 x g, 10 min, 4°C). Das Pellet wurde in 20 ml eiskalter 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach nochmaliger Zentrifugation der Zellen (5000 x g, 10 min, 4°C) werden diese in 1 ml eiskalter 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung aufgenommen und für 3 h auf Eis inkubiert. Die CaCl<sub>2</sub>- kompetenten Zellen wurden nach Zugabe von 10 % (v/v) Glycerin in 100 µl aliquotiert und bei -70 °C eingefroren und gelagert.

### 2.5.10 Transformation von *Escherichia coli*

Transformation meint die Aufnahme von Plasmid-DNA durch ‚kompetente‘ *E.coli*. Dabei wird die zu transformierende Plasmid-DNA mit den kompetenten Bakterien gemischt. Durch den Kompetenzzustand der Zellen wird die Fremd-DNA an der Bakterienoberfläche gebunden. Durch einen kurzen Hitzeschock wird die Membran destabilisiert, so dass die DNA in das Zytoplasma gelangen kann. Durch anschließende Kultur auf Selektivmediumplatten erhält man die Kolonien, die durch das transformierte Plasmid eine Antibiotikaresistenz erhalten haben.

100 µl kompetenter *E. coli*- Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut, mit 10-100 ng Plasmid-DNA versetzt und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde ein Hitzeschock bei 42°C für 30s durchgeführt, was die Aufnahme der DNA bewirkt. Dann wurden 250 µl SOC-Medium zugegeben und 1 h unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die transformierten Bakterien auf Agarplatten mit Selektivmedium ausplattiert und ü.N. bei

37°C inkubiert. Die entstehenden Einzelkolonien wurden in 2,5 ml Medium kultiviert und die Plasmid-DNA zur Kontrolle gereinigt und z.B. durch Restriktionsverdau analysiert.

### 2.5.11 TOPO-TA-Klonierung

Um PCR-Fragmente ohne Modifikation in einen Vektor zu ligieren, werden sie in den Vektor pCR2.1-TOPO (Invitrogen, siehe Abb. 2.1) kloniert. Dabei unterbricht ein in die Insertionsstelle des Vektors ligiertes PCR-Fragment den ORF („open reading frame“) des LacZ-Gens und macht es dadurch funktionslos. Bakterien, die nur den religierten Vektor enthalten, exprimieren dagegen ein funktionsfähiges LacZ. Zusammen mit genomisch kodierten Proteinen setzt es das im Medium enthaltene X-Gal (nach Induktion mit IPTG) zu einem blauen Farbstoff um, der die Kolonien kennzeichnet.

Taq-Polymerasen besitzen eine terminale Transferaseaktivität, die Desoxyadenosine an die 3'-Enden der PCR-Produkte anhängt. Der linearisierte Vektor besitzt 3'-überhängende Desoxythymidine. Damit ist der Vektor für PCR-Produkte, die mit einer Taq-Polymerase amplifiziert werden, konzipiert. Die Ligation erfolgt durch eine Topoisomerase, die an den Vektor gekoppelt ist. Der Ansatz wird in *E.coli* TOP 10F transformiert. Nach Ausplattieren auf LB-Agarplatten mit Antibiotikum, können die positiven Klone durch Blau-Weiß-Selektion ausgewählt werden.

Ligationsansatz:	PCR-Produkt	4µl
	Salt Solution (Invitrogen)	1µl
	TOPO Vektor (Invitrogen)	1µl
	15 min, RT	

2µl des Ligationsansatzes wurden in kompetente *E.coli* TOP 10F' transformiert (siehe Kapitel 2.5.10).

### 2.5.12 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

#### Minipräparation

Zur Isolierung analytischer Plasmidmengen wurde die Plasmid-DNA über eine Fiberglasmatrix des GFX Micro Plasmid Prep Kits (Amersham Pharmacia Biotech) laut Herstellerangaben aufgereinigt.

#### Maxipräparation

Für die Plasmidisolierung im präparativen Maßstab wurde die Plasmid-DNA nach QIAGEN Plasmid Maxi Protocol (Qiagen) mit QIAGEN-tip 500 über eine Anionenaustauschersäule aufgereinigt. Die isolierte DNA wurde bei -20°C gelagert.



**Photometrische Quantifizierung von DNA**

DNA zeigt bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260 \text{ nm}$  ein Absorptionsmaximum. Zur Bestimmung der Konzentration wird ein Aliquot der DNA-Lösung so mit Wasser verdünnt, dass die Extinktion der Lösung bei  $\lambda = 260 \text{ nm}$  im linearen Bereich ( $OD_{260}=0,1-1,0$ ) liegt. Nach Messung der optischen Dichte kann die Konzentration der Lösung bestimmt werden, dabei entspricht 1  $OD_{260}$  einem Gehalt von 50  $\mu\text{g/ml}$  an doppelsträngiger DNA. Zur Berechnung gilt daher:  $(OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 50) / 1000 = c_{\text{DNA}} [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$ .

Gerät: Gene Quant II (Amersham Pharmacia Biotech)

**2.5.13 Mutagenese**

Zur Herstellung von konstitutiv aktiven Rap1A wurde mit Hilfe des QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) ein Aminosäureaustausch Rap1AG12V durchgeführt. Das Prinzip der ‚Site-directed mutagenesis‘ besteht aus spezifischen Primern, die die entsprechende Mutation enthalten, einer PCR mit der *PfuTurbo*® DNA Polymerase und anschließendem Verdau der Ausgangs-DNA ohne Mutation mit der Endonuklease DpnI. DpnI erkennt dabei spezifisch die durch *E.coli* methylierte Ausgangs-DNA, aber nicht die einen ‚nick‘ enthaltende DNA mit der gewünschten Mutation. Nach PCR und DpnI-Verdau wurde der Ansatz dann wie unter 2.5.10 beschrieben in *E.coli* transformiert. Die eingefügte Mutation wurde durch Sequenzierung überprüft.

**2.5.14 DNA-Sequenzierung**

Die von Sanger entwickelte Methode zur enzymatischen Sequenzierung von DNA-Fragmenten basiert auf der Verwendung von Dideoxynukleotiden als Analoga zu den Deoxynukleotiden. Durch den zufälligen Einbau der Dideoxynukleotide mittels PCR kommt es zum Kettenabbruch der DNA-Synthese, da durch das Fehlen des notwendigen 3'-OH-Endes die Ausbildung der nächsten Phosphodiesterbindung verhindert wird.

Die vier verwendeten Dideoxynukleotide sind mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, so dass die Fragmente bei Anregung mit einem Laserstrahl unterschiedliche Emissionsspektren aufweisen und unterschieden werden können. Das entstandene DNA-Gemisch wird gelelektrophoretisch aufgetrennt und per Laseranregung in einem computergestützten, automatischen Verfahren die Nukleotidsequenz der DNA ermittelt.

Zur Sequenzierung wurde der ABI PRISM® Sequencing Kit ‘Big Dye<sup>TM</sup> Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction’ mit dem ‘BigDye Premix’ (PE Applied Biosystems) verwendet.

Reaktionsansatz :	DNA	0,5	µg
	Primer	3,2	pmol
	Premix	2	µl
	H <sub>2</sub> O	ad	10µl
PCR-Programm :	1 Zyklus	96°C	5 min
	25 Zyklen	96°C	15 s
		50-55°C	15 s
		60°C	4 min
	1 Zyklus	4°C	unbegrenzt

Die Analyse der fluorescent markierten DNA-Fragmente wurde von der Firma GATC Biotech AG in ‚single-read‘ Genauigkeit übernommen. Zur Auswertung und Bearbeitung der Sequenzen wurde das Programm DNASTAR und Gene Runner verwendet.

### 2.5.15 Isolierung von Gesamt-RNA und mRNA

Zur Isolierung von RNA wurden Organe einer Maus oder eine konfluent-bewachsene 10 cm-Platte der jeweiligen Zelllinie mit PBS gewaschen, mit 3-6 ml RNAzol B (WAK-Chemie Medical GmbH) überschichtet und damit abgespült. Die Organe wurden in einem Glaspotter homogenisiert. Dann wurden die in RNAzol B enthaltenen Proben zu 1ml aliquotiert, wobei jeweils 100µl Chlorophorm vorgelegt wurden. Dieses Gemisch wurde für 30 s geschüttelt, dann 5 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 12000x g für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Die RNA-enhaltende obere Phase wurde vorsichtig abgenommen, auf 500µl Isopropanol pipettiert und anschließend zum Fällern der RNA für 1-5 Tage bei –70°C gelagert. Die gefällte RNA wurde bei 12000x g für 15 min bei 4°C abzentrifugiert. Danach wurde das Pellet mit 800µl 75%igem Ethanol gewaschen und nochmals bei 7500x g für 8 min bei 4°C zentrifugiert. Die Pellets jeder Zelllinie/jedes Organs wurden gepoolt und in insgesamt 30-50 µl DEPC-H<sub>2</sub>O resuspendiert.

Es wurden die Konzentration ( $c [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \text{Verdünnungsfaktor} \times 40 \times \text{OD}_{260} / 1000$ ) und der Reinheitsgrad ( $R = \text{OD}_{280} / \text{OD}_{260} > 1,9$ ) jeder RNA-Präparation bestimmt.

Für die mRNA Herstellung wurde aus Gesamt-RNA mit Hilfe des mRNA Isolation Kits von Roche gemäss den Angaben des Herstellers die enthaltene mRNA isoliert.

### 2.5.16 Herstellung von cDNA aus RNA

Zur Herstellung von komplementärer DNA aus RNA wurde das Superscript II Kit (Gibco) mit folgenden Ansätzen verwendet:

Ansatz A	RNA	3µg	
	OligoDT oder GSP	1µl	
	10mM dNTP	2,5µl	
	DEPC-H <sub>2</sub> O	ad 25µl	
			Inkubation für 5 min bei 65°C, auf 50°C abkühlen und Ansatz B zupipettieren.

Ansatz B	10x Puffer	5µl
	25mM MgCl <sub>2</sub>	10µl
	0,1 M DTT	5µl
	Rnase OUT	1µl
	DEPC-H <sub>2</sub> O	ad 25µl

Zu dem Gesamtansatz von 50µl wurde 1µl Superscript II RT gegeben und bei 50°C für 50 min. inkubiert. Die Reaktion wurde durch einen Temperaturwechsel auf 70°C für 15 min gestoppt, anschließend auf Eis abgekühlt und durch Zugabe von 1µl RNase H die restliche RNA für 20 min bei 37°C verdaut. Aus der so hergestellten cDNA wurden mittels spezifischen Primern (siehe Kapitel 2.5.2) und folgendem PCR-Programm Rap1A amplifiziert:

1 Zyklus	94°C	3 min
30 Zyklen	94°C	30 s
	56°C (Rap1A)	1 min
	72°C	2 min
1 Zyklus	72°C	7 min
1 Zyklus	4°C	unbegrenzt

### 2.5.17 Northern Blot

Mit Hilfe von Northern Blots sollte die Transkriptgröße der mRNA von PREL1 bestimmt werden. Dazu wurden verschiedene RNA-Sonden mit Hilfe des DIG RNA labeling Mix Systems (Roche) hergestellt und zum einen für einen kommerziellen Northern Blot mit humaner mRNA (First Choice<sup>TM</sup> Northern Human Blot I, Ambion) verwendet, zum anderen wurden die Blots selber hergestellt.

Bei dem kommerziellen Blot wurde nach Angaben des Herstellers verfahren.

Es wurde mRNA mit dem mRNA Isolation Kit (Roche) aus verschiedenen Zelllinien und Mausorganen isoliert und in einem Glyoxal/DMSO System (Clark, 1997; Koelle und Herman, 1994) elektrophoretisch getrennt (2µg mRNA/ Probe). Nach der Elektrophorese in einem 1%-igen Agarosegel unter RNase-freien und denaturierenden Bedingungen, folgte der Kapillar-

Transfer mit 20xSSC (3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat; pH 7,0) auf eine positiv geladene Membran (Hybond N+, Amersham). Die RNA wurde auf der Membran in der Mikrowelle bei 850W für 2min. fixiert und anschliessend das Glyoxal mit 20mM Tris, pH 8,0 entfernt, um eine Bindung der Sonde an die fixierten Nukleinsäuren zu ermöglichen.

Die Prähybridisierung erfolgte für eine halbe Stunde bei 68°C mit Ultrahyb Hybridisierungslösung (Ambion) in einem Hybridisierungsofen. Die Hybridisierung mit 100 ng/ml Sonde wurde o/n bei 68°C durchgeführt. Anschliessend wurde die Membran 2x5 min. bei RT mit Low Stringency Buffer und danach 15 min. bei 68°C mit High Stringency Buffer gewaschen. Die Detektion der gebundenen Sonde erfolgte mit Hilfe des DIG-Systems (Roche) gemäss den Anweisungen des Herstellers.

Die Entwicklung des Blots wurde mit CDP-Star Reagenz (Roche) durchgeführt und die Exposition erfolgte mittels Röntgenfilm für 30sek. bis 10 min.

Alle benutzten Lösungen wurden gemäss des DIG Application Manual (for Filter Hybridization) von Roche angesetzt und verwendet.

#### **Verwendete RNA-Sonden, Oligos und Schnittstellen:**

PREL1 bp 1-750 (human) in pBlueskript Vektor:

for	ATGGGTGAGTCAAGTGAAGAC
rev	TCTGTGTCTCTTGTCCAGTC

PREL1 bp1629-2004 (murin): EST IMAGE ID 5009113 in pCMV-Sport6, Bsp120I/XhoI

EST IMAGE ID 4850912 (human) in pOTB7 Vektor plus 3'UTR und Poly-A Ende

GAPDH (rat) full length: z.V.g. von S. Lommel (GBF Braunschweig)

#### **Zusätzlich verwendete Lösungen:**

(alle Lösungen wurden in RNase-freiem DEPC-H<sub>2</sub>O angesetzt)

DEPC-H<sub>2</sub>O: 1% Diethylpyrocarbonat (DEPC) in H<sub>2</sub>O unter Erwärmen lösen (mind. 2h), anschliessend zweimal autoklavieren, um das DEPC zu zerstören.

6M (42%)Glyoxal: 4,2 g Glyoxal / 10ml DEPC-H<sub>2</sub>O auf 50°C für 45min. erwärmen, 1 g Säulenmaterial (AG501-X8, Bio-Rad) / 1ml Glyoxal-Lsg. zum Deionisieren verwenden.  
Das Säulenmaterial kurz mit ca. 1ml Glyoxal- Lsg. waschen, dann den Rest dazugeben und 1h bei RT rotierend inkubieren. Den pH-Wert mit pH-Papier überprüfen (pH 7), dann die Lösung durch einen Sterilfilter aliquotieren und bei -70°C lagern (50µl single-use-Aliquots).

Loading Buffer: 50% ,Glycerol  
 10mM NaPO<sub>4</sub>, pH 7.0  
 0,25% Bromphenolblau  
 0,25% Xylencyanol FF

## 2.6 Biochemische Methoden

### 2.6.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Verwendete Puffer und Lösungen:

4 x Probenpuffer: 4 ml 10% (w/v) SDS-Lösung  
 2,3 ml H<sub>2</sub>O  
 4 ml Glycerin  
 600 µl 0,5M Tris-HCl, pH6,8  
 400 µl 2-Mercaptoethanol  
 200 µl 5% (w/v) Bromphenolblau

Acrylamidlösung: 30% (w/v) Acrylamid  
 0,8% (w/v) N,N-Methylenbisacrylamid

Es wird die fertige Stammlösung Rotiphorese Gel 30 (Roth) verwendet.

Sammelgel (5%) : 1,8 ml H<sub>2</sub>O  
 320 ml 0,5M Tris-HCl, pH6,8  
 330 µl Acrylamidlösung  
 25 µl 10% SDS- Lösung  
 12,5 µl TEMED  
 12,5 µl 25% (w/v) Ammoniumpersulfatlösung (APS)

Trenngel :	7%	10 %	12,5 %	
	3,5 ml	2,5 ml	1,75 ml	H <sub>2</sub> O
	1,5 ml	1,5 ml	1,5 ml	1,5M Tris-HCl, pH 8,8
	1,5 ml	2 ml	2,75 ml	Acrylamidlösung
	60 µl	60µl	60µl	10% SDS-Lösung
	8 µl	8 µl	8µl	TEMED
	8 µl	8 µl	8 µl	25% APS

Elektrophoresepuffer: 25 mM Tris-Base  
 192 mM Glycin  
 0,1 % (w/v) SDS

Für die SDS-PAGE wurden Minigelapparaturen (Biometra) mit 1mm dicken 'Spacern' verwendet. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben mit 4x Probenpuffer versetzt und 5 min. bei 95°C aufgekocht.

Als Molekulargewichtsmarker dienten ein 10 kDa-Marker oder ein vorgefärbter Marker (MBI).

Für die Fokussierung im Sammelgel wurde eine Spannung von 120 V angelegt. Zur Auftrennung der Proben im Trenngel wurde die Spannung auf 180 V erhöht.

Das Gel wurde anschließend mit Coomassie gefärbt oder für einen Western Blot verwendet.

### 2.6.2 Coomassie-Färbung

Das Gel wurde ca. 30 min. in der Färbelösung geschwenkt, anschließend kurz mit Wasser gespült und solange entfärbt, bis die Proteinbanden deutlich wurden. Zur Aufbewahrung wurde das Gel auf einem Gel Trockner (Biorad) getrocknet.

Coomassie – Färbelösung :	0,1% (w/v)	Coomassie Brilliant Blue R250 (Serva)
	25 % (v/v)	Isopropanol
	10 % (v/v)	Essigsäure
	65% (v/v)	H <sub>2</sub> O
Coomassie – Entfärber :	10 % (v/v)	Essigsäure
	40 % (v/v)	Methanol
	50 % (v/v)	H <sub>2</sub> O

### 2.6.3 Expression und Reinigung von GST-Fusionsproteinen

Durch die Methode der Expression von Protein-Fragmenten als Fusionsproteine mit GST (Glutathion-S-Transferase) in *E.coli* können große Mengen eines Proteins in kurzer Zeit und mit geringem Aufwand produziert werden. Die Expressionsvektoren, die für die Konstruktion benutzt werden, stellen alle notwendigen Sequenzen, wie Translationsstart- und Terminationssequenzen, für die Expression zur Verfügung und beinhalten induzierbare Promotoren, da eine Überexpression heterologer Proteine normalerweise mit dem Wachstum der Bakterien interferiert. Infolge des induzierbaren Promotors, kann der Expressionsstamm bis zu einer bestimmten Dichte wachsen, bevor die Expression induziert wird. Somit wird die Wachstumsphase der Bakterien von der Expressionsphase getrennt.

Die vom Vektor stammenden Polypeptide des Fusionsproteins führen wichtige Merkmale in das exprimierte Protein ein. Zum einen können labile Proteine stabilisiert werden, zum anderen werden Eigenschaften für eine Einschnitt – Reinigung eingefügt.

Obwohl die meisten Fusionsysteme eine Protease-sensitive Sequenz zwischen den beiden Polypeptiden bereitstellen, die die Ablösung des Fusionspartners erlaubt, ist es sehr oft nicht möglich, ein stabiles Produkt zu erhalten, weil entweder die besondere Konformation des Fusionsproteins das Motiv der Protease (z.B. Thrombin) unzugänglich macht oder das fragliche Polypeptid ebenfalls bei der Prozedur verdaut wird.

Das Glutathion-S-Transferase (GST) Fusions-System ist ein geschlossenes System für die Expression, Reinigung und Detektion von Fusionsproteinen, die in *E.coli* produziert werden und wurde in dieser Arbeit für die Expression von verschiedenen Konstrukten verwendet.

20-50 ml einer Übernachtskultur von BL21 (CodonPlus)-Bakterien (Stratagene), die mit dem entsprechenden pGEX-6P-Plasmid transformiert wurden, wurden in 500ml- 1 l LB-Medium mit 50 µg /ml Ampicillin aufgenommen und bei 37°C und 180 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,6 kultiviert. Dann wurden 0, 1 mM (final) IPTG (0,1 M Stocklösung) zur Induktion des GST-Fusionsproteins und zusätzlich 1 ml/l 1 M Prolin zugegeben. Das zusätzlich hinzugefügte Prolin ermöglicht es den Bakterien, ausreichende Mengen dieser Aminosäure in das gewünschte eukaryotische Protein einzubauen, da diese selbst nicht in der Lage sind genügend Prolin zu produzieren. Deshalb verfügen die *E.coli* noch über ein zusätzliches Plasmid (Codon plus), um zusätzliche t-RNAs für Prolin und Arginin herstellen zu können.

Der Ansatz wurde 6h bei 20°C bzw. 4h, 37°C und 180 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Kultur zentrifugiert (20 min., 6000 x g, 4°C) . Das Pellet wurde entweder bei – 20°C eingefroren oder sofort in 10 ml kaltem PBS resuspendiert. Die Suspension wurde pro 10 ml mit einer Tablette Complete Mini<sup>TM</sup> Protease Inhibitor mit EDTA (Roche) und 5µl Benzonase versetzt. Mit Hilfe der French Press wurden die Bakterien zweimal bei 1200 – 1500 psi aufgeschlossen. Das Lysat wurde zentrifugiert ( 120 min. bei 15000 x g, 4°C) und das Sediment bis auf eine geringe Probe verworfen. Es wurden ebenso Proben vor und nach der Induktion und aus dem Lysat- Überstand mittels SDS-PAGE (siehe Kapitel 2.6.1) analysiert.

### **Reinigung der GST-Fusionsproteine**

Fusionsproteine sind leicht durch Affinitätschromatographie mittels Glutathion Sepharose 4 B (Pharmacia Biotech) aus dem Bakterienlysat zu reinigen. Glutathion ist aufgrund von Epoxy-Aktivierung an Sepharose 4 B durch Kopplung an die Oxiran – Gruppe gebunden. Da die Struktur von Glutathion komplementär zur Bindungsseite der Glutathion-S-Transferase (GST)-Bindungsstelle ist, können dadurch Fusionsproteine schon durch einen einzigen chromatographischen Schritt bis zu 90 % gereinigt werden.

Das klare Lysat wurde nach Aufschluss und Zentrifugation direkt auf die Säule gegeben. Nach Bindung des Fusionproteins an die Matrix, wurde diese gewaschen, um alle unspezifisch gebundenen Proteinen zu entfernen.

Für ‚pull down‘ Experimente verblieb das Fusionsprotein an der Sepharose. Diese wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –70°C gelagert. Für die Overlays

wurde das Fusionsprotein mit 10mM reduziertem Glutathion (GSH, Sigma) in 50ml 50mM Tris-HCl, pH8,0 von der Säulenmatrix eluiert.

Für die Herstellung des polyklonalen Serums wurde das gereinigte Protein von der GST durch eine Sequenz-spezifischen Protease getrennt. Die PreScission-Protease (Amersham Pharmacia Biotech) erkennt die Sequenz Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln<sup>↓</sup>Gly-Pro direkt vor der multiplen Klonierungssequenz (MCS) im pGEX –6P1– Plasmid und schneidet zwischen Gln und Gly-Resten.

Der Lysat-Überstand wurde mit Glutathion Sepharose 4 B unter Schütteln 1 h bei 4°C inkubiert. Dann wurde die Säule mit PreScission Cleavage Buffer so lange gewaschen, bis keine OD<sub>280</sub> –Änderung mehr messbar war. Das Säulenmaterial wurde mit 100 µl (200 U) PreScission Protease versetzt. Der Verdau erfolgte 24 h bei 4°C unter Schütteln. Anschließend wurde das von GST getrennte Protein mit PBS eluiert.

PreScission Cleavage Buffer :	50 mM	Tris-HCl (pH 7,0)
	150 mM	NaCl
	1 mM	EDTA

### Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Proteinkonzentration einer Probe kann durch die Messung der Absorption bei 280 nm in einem Photometer bestimmt werden. Die gemessene Optische Dichte (OD<sub>280</sub>) wurde mit dem Faktor 0,8 multipliziert, um die Proteinkonzentration zu erhalten.

$$OD_{280} = 1,0 = 0,8 \text{ mg / ml} = c_{\text{Protein}}$$

### 2.6.4 Immunpräzipitation und ‚pull down‘

Für die Immunpräzipitation wurden Zellen in 10cm Gewebekulturschalen in hoher Dichte verwendet. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und in 500µl IP-Puffer (8mM Tris base, 12mM HEPES, 50mM NaCl, 15mM KCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM EGTA, 20mM NaF, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1% PEG 6000, and Complete Mini<sup>TM</sup>, EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche)) plus Triton X-100 (TX-100, Sigma) oder ohne TX-100 für 10 min. auf Eis gehalten. Anschliessend wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Platte gelöst. Der Ansatz ohne Detergenz wurde für dreimal 10s in einem Ultraschall-Bad (kalt) und vortexen aufgeschlossen. Es folgte eine Zentrifugation bei 12.000xg für 15min. bei 4°C.

Der Überstand wurde dann für die IP mit 5µg des entsprechenden Antikörpers versetzt und für 45 min. auf Eis inkubiert. Anschliessend wurden 30µl Protein-G-Sepharose (Amersham) zugesetzt und für weitere 45 min. rotierend inkubiert.



Für die ‚pull downs‘ wurden dem Überstand 20 –30 µl des GST-Fusionsproteins an Glutathion Sepharose zugesetzt. Es folgte eine Inkubation für 45 min. bei 4°C (rotierend). Durch Zentrifugation (300xg, 3min., 4°C) wurden die beads pelletiert und zweimal mit IP-Puffer gewaschen. Letzlich wurde die Sepharose in 50µl 4xPP aufgenommen, aufgeköcht und im SDS-PAGE aufgetrennt.

### **2.6.5 Protein-Overlay assay auf immobilisierten Peptiden und Lipiden**

200µg/ml der gereinigten rekombinanten EVH1 Domänen von Mena, VASP und EVL als GST-Fusionsproteine (Carl et al., 1999) in TBS-T plus 10% FCS wurden mit Peptid-Scans des N- oder C-Terminus des murinen PREL1 wie beschrieben inkubiert (Niebuhr et al., 1997). Die Detektion erfolgte in Analogie zu einem Western Blot (siehe 2.7.1) indem ein monoklonaler Antikörper gegen GST mit den Membranen inkubiert wurde.

Für den Lipid-Overlay wurde ein ‚PIP-Strip‘ (Echelon Research Inc.) mit 0,01µg/ml der rekombinanten PH-Domäne von PREL1 als GST-Fusionsprotein inkubiert und gemäss den Angaben des Herstellers verfahren.

Die Auswertungen der Peptid-Scans und des ‚PIP-Strips‘ erfolgten mittels Chemilumineszenz. Die Quantifizierung und Evaluation der Signalstärke wurden durch eine CCD-Kamera (Fujifilm Image Reader LAS-1000 v2.5) und AIDA Image Analyzer v3.21 Software ermittelt und ausgewertet.

### **2.6.6 Ras Aktivierungs assay (Ras activation assay)**

Kleine GTPasen binden im aktiven Zustand GTP, im inaktiven GDP (siehe Kapitel 1.3). In einem Ras activation assay präzipititert man in einem ‚pull down‘ mit einer Ras-Bindedomäne nur die aktivierte GTPase und kann somit deren Aktivität in der Zelle bestimmen.

Für das Experiment wurden NIH3T3 Fibroblasten in einer Zellzahl von  $2 \times 10^6$  Zellen auf Fibronectin (20µg/ml) beschichtete Gewebekulturschalen replattiert und nach bestimmten Zeitpunkten für den Ras activation assay (Upstate) lysiert. Dabei wurde nach Angaben des Herstellers verfahren. Die Auswertung erfolgte aus drei unabhängigen Versuchen mittels Chemilumineszenz und CCD-Kamera (siehe 2.6.5). Die statistische Auswertung erfolgte mit den Software Programmen Microsoft Excel 2001 und SigmaPlot 8.

## 2.7 Immunologische Methoden

### 2.7.1 Western Blot

Der Western Blot erlaubt den spezifischen Nachweis von Proteinen. Das allgemeine Prinzip ist, die durch SDS-PAGE ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennten Proteine auf eine feste Matrix zu transferieren. Der Proteintransfer wurde im 'semi-dry'-Verfahren (Semi-dry-Blotter, Phase Aachen) mit einer PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran (Immobilon-P, Millipore) durchgeführt.

Die Membran wurde vor dem Transfer mit 100% Methanol aktiviert und anschließend wie das Gel und 4 Lagen auf Gelgröße zugeschnittenes dickes Whatman-Papier kurz in Blotpuffer äquilibriert. Die einzelnen Lagen wurden luftblasenfrei auf die Kathode wie folgt geschichtet:

- 2 Lagen Whatman – Papier
- SDS-Gel
- PVDF – Membran
- 2 Lagen Whatman – Papier als direkter Abschluss zur Anode

Der Transfer erfolgte 1-1,5 h bei 120 mA.

Nach dem Proteintransfer fand der Nachweis des gesuchten Proteins mit spezifischen Antikörpern statt.

Blotpuffer :	50 mM	Tris-Base
	39 mM	Glycin
	0,037 % (w/v)	SDS
	20 %	Methanol

### 2.7.2 Immunfärbung und Detektion mittels Chemilumineszenz

Verwendete Puffer und Lösungen

TBS-T :	20 mM	Tris-HCl, pH 7,6
	137 mM	NaCl
	0,1 % (v/v)	Tween 20

Zum Absättigen der PVDF – Membran wurde diese über Nacht bei 4 °C oder 1 h bei RT mit 10 % FCS bzw. 10 % Milchpulver (w/v) in TBS-T inkubiert.

Anschließend wurden je nach Ursprung des verwendeten Antikörpers monoklonale Antikörper als unverdünnter Kulturüberstand oder affinitätsgereinigter Antikörper in 1% Milchpulver (w/v)/TBS-T verdünnt mit der Membran inkubiert (1h,RT). Der Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper wurde bis zu einer Verdünnung von 1: 2000 in 10 % FCS bzw. 1% Milchpulver (w/v) in TBS-T eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug jeweils 1 h bei

RT auf einem Schwenktisch. Nach jedem Inkubationsschritt wurde die Membran für je 10 min. mit

1. TBS – T
  2. TBS – T + 0,5 M NaCl
  3. TBS – T + 0,5 % (v/v) TritonX-100
- gewaschen.

Bei Verwendung von Antikörpern, die mit geringerer Affinität zum Antigen binden, kann alternativ zu dem o.a. Waschprotokoll auch mit einem weniger stringenten Protokoll für je 5 min. gewaschen werden.

1. 10 % Trockenmilch (fettarm) in TBS – T
2. 1 % Trockenmilch (fettarm) in TBS – T
3. TBS – T

### **Detektion gebundener Antikörper mittels Chemilumineszenz**

Die Detektion mittels Chemilumineszenz stellt ein hochsensitives Nachweisverfahren zur Detektion von immobilisierten Antigenen dar. Sie basiert darauf, dass die Peroxidase, die an den Sekundärantikörper gekoppelt ist, in Anwesenheit von  $H_2O_2$  Luminol oxidiert. Dabei wird Licht freigesetzt, welches einen Röntgenfilm belichtet.

Das 'Lumi-Light Western Blot Substrat' (Roche) wurde den Angaben des Herstellers entsprechend angesetzt. Die gewaschene Membran wurde für ca. 1-2 min. bei RT mit der proteintragenden Seite nach oben mit Substrat benetzt. Nach Ablauf des Substrates, wurde die Membran luftblasenfrei zwischen zwei Klarsicht-Folien gelegt. Auf der so eingeschlagenen Membran wurde für einige Sekunden bis zu 15 min. (je nach Reaktionsstärke) ein Röntgenfilm (Hyperfilm<sup>TM</sup> ECL, Amersham Biosciences) belichtet. Dieser wurde in einer automatischen Entwicklungsmaschine (Agfa Curix 50) nach Angaben des Herstellers entwickelt.

### **2.7.3 Generierung von Antikörpern**

#### **Herstellung polyklonaler Antikörper**

Die Herstellung polyklonaler Antikörper wurde von den Firmen Biogentech (Brüssel, Belgien) und BioGenes (Berlin) durchgeführt. Es wurden dafür je zwei 2-6 Monate alte Kaninchen (Deutscher Riese) parallel immunisiert.

Das ausgewählte Peptid wurde vor der Immunisierung unter Verwendung des ‚Inject Maleimide Activated Immunogen Conjugation Kit‘ (Pierce) an Ovalbumin gekoppelt, da Peptide selbst zu klein sind, um eine ausreichende Immunantwort zu erzeugen. Dazu wurden 2-3 mg Peptid in Konjugationspuffer gelöst. 2 mg aktivierten Ovalbumins wurden in 200 µl deionisiertem Wasser gelöst. Die Peptidlösung wurde sofort zur Ovalbuminlösung gegeben und für 2 h bei RT auf einem Überkopf-Schüttler inkubiert. Über Gelfiltration wurde EDTA aus der Konjugationslösung entfernt, wobei die Säule zunächst mit 3-5 Säulenvolumen Reinigungspuffer gewaschen wurde. Das Konjugat wurde auf die Säule gegeben und mit Reinigungspuffer wieder eluiert, wobei Fraktionen von 0,5 ml gesammelt wurden. Von den Fraktionen wurde jeweils die OD<sub>280</sub> gemessen und die vier Fraktionen mit der höchsten Absorption gepoolt. Für die Immunisierung von 2 Kaninchen wurden 5 Aliquots zu je 1 ml Peptidlösung benötigt, wobei das erste Aliquot die doppelte Menge an Antigen enthielt. Die Aliquots wurden mit PBS auf 1 ml aufgefüllt.

Konjugationspuffer, pH 7,2 : 83 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
 0,1 M EDTA  
 0,9 M NaCl  
 0,025 M NaN<sub>3</sub>

Reinigungspuffer, pH 7,2 : 83 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
 0,9 M NaCl

### Peptide zur Immunisierung

PREL1-Peptide: PREL1 AS 1-420  
 PREL1A: C-KKENKETNEKMNAKNKEYLL  
 PREL1B: C-EIETTKDEKQGLGNHSPGATR  
 PREL1C: C-PKRQENQGLPGAPGNSEQDFM  
 VASP-Peptide: VASP-A: C-ELEQQKRQPEHMERRVSNA  
 VASP-B: C-ATQVGEEKPPKDESASQEESEARLPAQ  
 VASP-C: C-TLPRMKSSSSVTTSEAH PSTPCSSDDS

### 2.7.4 Reinigung polyklonaler Antikörper

Zur Herstellung der Affinitätssäule wurden 2g CNBr-aktivierte Sepharose 4 B in Pulverform (Pharmacia Biotech) mit 200 ml H<sub>2</sub>O, 200 ml 5mM HCl und anschließend 200 ml Kopplungspuffer auf einer Glasfritte gewaschen. Die Sepharose wurde nun in 7 ml Kopplungspuffer mit 2,5 mg Peptid überführt und über Nacht bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Das Säulenmaterial wurde anschließend mit 1,5M Tris-HCl (pH 8,8) gewaschen

und 1 h damit unter Schütteln inkubiert. Die Säule wurde nach diesem Absättigungsschritt mit PBS gewaschen.

20 ml Kaninchen-Serum wurden dreimal auf die vorbereitete Säule gegeben. Die Säule wurde zuerst mit 100 ml PBS gewaschen und dann mit Vorwaschpuffer solange weiter gewaschen, bis keine OD<sub>280</sub>-Änderung mehr messbar war. Die polyklonalen Antikörper wurden nun mit Elutionspuffer in Fraktionen von 1,5 ml eluiert und jeweils die OD<sub>280</sub> gemessen. Jede Fraktion wurde außerdem durch Zugabe von 100 µl 1,5 Tris-HCl (pH 8,8) neutralisiert.

Die Fraktionen mit den höchsten Absorptionen wurden gepoolt und über Nacht bei 4°C gegen PBS dialysiert, mit Hilfe von Centriplus (Millipore) aufkonzentriert, um letztendlich die Antikörperkonzentration zu bestimmen. Die Antikörper wurden aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Kopplungspuffer:	0,1 M Borsäure 0,5 M NaCl	pH 8,4
Vorwaschpuffer:	0,1 M Na-Acetat 0,5 M NaCl	pH 4,8
Elutionspuffer:	0,2M Na-Acetat 0,5M NaCl	pH 2,5

Die in dieser Arbeit verwendeten primären Antikörper sind in Kapitel 2.10, Tabelle 1 zusammengefasst.

## 2.8 Zellbiologische Methoden

### 2.8.1 Standardkultur

Die Zellen wurden in sterilen Gewebekulturschalen (Nunc, Corning) mit den Durchmessern 100 mm, 60 mm, 30 mm mit 10 ml, 5 ml bzw. 2 ml des jeweiligen Mediums kultiviert. Die Inkubation erfolgte in einem Brutschrank (Forma Scientific) bei 37°C in einer 7 % igen (v/v) CO<sub>2</sub> – Atmosphäre.

### 2.8.2 Allgemeine Gewebekulturarbeiten

#### 2.8.2.1 Kultur auf Deckgläsern

Zur mikroskopischen Beobachtung wurden die Zellen auf vorbehandelten Deckgläsern kultiviert. Die Deckgläser wurden mit 60 % EtOH / 40 % HCl (30 min.) gereinigt und anschließend ausgiebig mit demineralisiertem H<sub>2</sub>O gewaschen, so dass sie fett- und staubfrei vorlagen. Es folgte die Sterilisation im Autoklaven (120°C. 30min.).

### 2.8.2.2 Passagieren von Zellen

Adhärenent wachsende Zellen wurden nach Erreichen der Konfluenz durch enzymatisches Aufbrechen der Zell-Matrix-Verbindungen (mit Trypsin/EDTA, Gibco) vom Boden der Kulturschale abgelöst und verdünnt in eine neue Kulturschale wieder ausgesät.

Die Zellen wurden zunächst einmal mit vorgewärmten PBS gewaschen und in Trypsin-EDTA-Lösung (TE; Gibco) solange inkubiert, bis sich die Mehrzahl der Zellen sichtbar abrundete. Anschließend wurden sie mit einer Pipette abgespült, vereinzelt und mit frischem vorgewärmten Medium verdünnt. Die Zellen wurden nach einmaligem Waschen in Medium in einer neuen Kulturschale wieder ausgesät.

Trypsin/EDTA : 0,5 mg/ml Trypsin und 0,2 mg/ml EDTA in modifizierter „Puck's Saline“, Gibco

### 2.8.2.3 Einfrieren und Auftauen

Zum Einfrieren wurden die Zellen abtrysiniert und in Medium resuspendiert, in Falconröhrchen (Nunc) überführt und 3 min. bei 950 rpm abzentrifugiert (Heraeus). Das Zellpellet wurde in eiskaltem FCS mit 8% Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma) resuspendiert und die Zellsuspension in Kryoröhrchen (je 500µl) aliquotiert. Die Röhrchen wurden kurzfristig bei -70°C eingefroren und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurden die Zellen in Kryoröhrchen im 37°C – Wasserbad erwärmt und in kaltem Kulturmedium in einem Falconröhrchen (Nunc) bei 950 rpm, 3 min. zentrifugiert. Das Zell- Sediment wurde in Wachstums –Medium resuspendiert und die Zellen auf Gewebe-Kulturschalen (Nunc oder Corning) ausgesät.

### 2.8.2.4 Interaktion von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen mit Antigen-präsentierenden Zellen (APCs)

Wenn T-Zellen *in vivo* ihr spezifisches Antigen von einer APC präsentiert bekommen, kommt es zur Interaktion beider Zelltypen. Diese Interaktion führt zur Auslösung der adaptiven Immunantwort. Eine Antigenerkennung *in vitro* führt darüber hinaus ebenfalls zur Bildung von Zellpaaren und ermöglicht es, durch Fixierung der Zellen, Untersuchungen der Eigenschaften dieser Interaktionen durchzuführen.

Für die Interaktionen von DO11.10-CD4<sup>+</sup>-T-Zellen dienten naive BALB/c-B-Zellen als Antigen-präsentierende Zellen. Die Inkubation der einzelnen Zelltypen erfolgte jeweils für 2h im CO<sub>2</sub>-Inkubator. Die naiven B-Zellen wurden 24h vor der Interaktion mit 100µg /ml OVA-Peptid (12er-Peptid aus Ovalbumin) beladen und im Verhältnis 1:1 mit den frisch isolierten T-

Zellen inkubiert. Die präaktivierten B-Zellen wurden 3h vor der Interaktion isoliert und nochmals mit 50µg/ml OVA-Peptid beladen.

Nach 2h wurden die Zellen auf Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen (rund, Ø15mm) transferiert und nach 10 min. mit 4% PFA fixiert (durchgeführt von B. Dornbach, GBF Braunschweig).

### **2.8.3 Transfektion eukaryotischer Zellen**

Bei der Transfektion wird Plasmid-DNA oder generell Fremd-DNA in eine eukaryotische Zelle eingebracht. Im Komplex mit den Transfektionsreagenzien wird dabei die Plasmid-DNA durch die Zellmembran in die Zellen eingeschleust.

Die zu transfizierende DNA wurde durch Plasmidpräparation aufgereinigt. Die Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion so ausgesät, dass sie zum Transfektionszeitpunkt eine Konfluenz von 50-80% erreicht hatten.

Es gibt mehrere Verfahren für die Übertragung von DNA in Zellkultur-Zellen, in dieser Arbeit wurde das FuGENE 6-Transfektionsreagenz (Boehringer), sowie SUPERFECT™ Transfektionsreagenz (Qiagen) verwendet.

Es wurden zu 94 µl Medium (ohne Zusätze) 6 µl FuGENE 6-Transfektionsreagenz und 2 µg DNA zugegeben und 15 min. bei RT inkubiert. Diese Lösung wurde anschließend zu frischem Wachstumsmedium von einer 3 cm-Kulturschale pipettiert und durch vorsichtiges Schwenken gleichmäßig verteilt. Die Transfektion erfolgte im Brutschrank über einen Zeitraum von 15-24 h.

Für eine Transfektion mit SUPERFECT™ wurden 300 –500 µl Medium (ohne Zusätze), 2 µg DNA und 6 µl SUPERFECT 15 –20 min. bei RT inkubiert und anschließend mit Standardmedium auf das gewünschte Volumen (bei 3 cm-Kulturschale 2 ml Medium) aufgefüllt. Das alte Medium wurde von den Zellen abgesaugt und durch den Transfektionsansatz ersetzt.

### **2.8.4 Herstellung von Zellextrakten**

Zur Herstellung von Extrakten aus Zelllinien wurden pro konfluent bewachsener 10 cm-Petrischale 400-600 µl 4 x Probenpuffer (siehe Kapitel 2.6.1) verwendet. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, dann durch Zugabe des Probenpuffers lysiert und anschließend mit Hilfe eines Zellschabers (Greiner) von der Petrischale geschabt. Die Lagerung erfolgt bei –20°C.

Um die DNA in dem Extrakt zu zersetzen, kann diesem 100 mM DTT (Endkonzentration) zugesetzt werden.

### **2.8.5 Stimulierung mit Phorbolestern**

Transfizierte NIH3T3 Zellen wurden auf 12mm Glascoverslips replattiert und nach 16-18h mit TPA (1µg/ml) in Kulturmedium für 15min. stimuliert und anschliessend fixiert.

A7r5 Zellen wurden zur Induktion von Podosomen für 30min. bzw. 60min. mit 1µM PDBu in Kulturmedium behandelt und anschliessend fixiert.

## **2.9 Digitale Fluoreszenzmikroskopie**

Die gesamte Immunfluoreszenz-Mikroskopie des Zytoskeletts der Zelle wurde im Prinzip wie in (Herzog et al. 1994) und (Mies et al. 1998) beschrieben, durchgeführt.

Bei der Fluoreszenzmikroskopie werden spezielle Fluoreszenzfarbstoffe (Fluorochrome) an Proteine oder andere Zellbestandteile gekoppelt. Durch Anregung dieser Farbstoffe mit einer definierten Wellenlänge emittieren sie Licht mit einer längeren Wellenlänge, beginnen also zu fluoreszieren. Dadurch ist es möglich, die räumliche und zeitliche Lokalisation der markierten Zellbestandteile in einer lebenden oder fixierten Zelle zu bestimmen.

Das optische System eines Fluoreszenzmikroskops weist im Gegensatz zu einem normalen Mikroskop einige Besonderheiten auf. Es besteht aus zwei Sperrfiltern und einem dichroischen Spiegel. Eine Quecksilberdampflampe oder bei Lebendbeobachtungen eine steuerbare Halogenlampe mit Dimmer, strahlt Licht auf den ersten Spiegel. Durch einen Anregungsfilter vor dem Objektiv trifft nur Anregungslicht auf das Objekt. Ein Emissionsfilter lässt dann nur energieärmeres fluoreszentes Licht ins Okular.

### **GERÄTE**

#### **Mikroskop:**

Epifluoreszenzmikroskop Axiovert 135 TV (Carl Zeiss) mit regelbarer 100 W Quecksilberdampflampe (AttoArc System, Carl Zeiss) oder Halogenlampe und manuell oder Software kontrollierbarem Filterrad; durch Optovar-Linsen lässt sich die Objektivvergrößerung um das 1,6fache bzw. 2,5fache erhöhen.

Das Mikroskop ist zusätzlich mit elektrisch aktivierbaren Schnellverschlüssen, sowie einem CCD-Kamerasystem (Cooled-charged-coupled-device) von Princeton Instruments ausgestattet.



**Objektive:**

Plan-Apochromat- oder Plan-Neofluar-Immersionsölobjektive (Carl Zeiss)

Das verwendete Immersionsöl (Carl Zeiss) hat einen Brechungsfaktor von 1,518, welcher ähnlich zum Glas ist.

**Beleuchtung:**

Die Regelung der Beleuchtung erfolgt durch elektrisch aktivierbare Schnellverschlüsse (UniBlitz Modul D122 Shutter-Driver, Visitron Systems), Shutter, manuell oder Software-unterstützt.

**Cooled-Charged-Coupled-Device (CCD)-Kamerasystem :**

Auf  $-20^{\circ}\text{C}$  gekühlte CCD-Kamera (TE/CCD-1000 TKB, Princeton Instruments Inc.) mit elektronisch aktivierter Kontrolleinheit und Verschluss.

**Aufnahmekontrolle und Bildverarbeitung :**

Die Aufnahmekontrolle, Kontrolle der Schnellverschlüsse, die Kamerasteuerung und Bildbearbeitung erfolgte mit der IPLab Spectrum Scientific Imaging Software 5.5 an einem Apple Macintosh 9500/200. Die weitere Bildverarbeitung für die Präsentation erfolgte mit Adobe Photoshop 6.0 und Adobe Page Maker an einem Apple Macintosh 9500/350.

## **2.9.1 Immunfluoreszenzmikroskopie fixierter Zellen**

### **Beschichtung der Deckgläser**

Für die Fluoreszenzfärbungen wurden die Zellen auf unterschiedliche Substrate ausgesät, um die Ausbildung verschiedener Strukturen zu induzieren bzw. positiv zu unterstützen.

In dieser Arbeit wurden Fibronectin und Laminin als Substrate verwendet. Für einige Zelllinien kann man mehrere Substrate wählen, für andere kommt nur eines in Frage, da den Zellen die Rezeptoren für andere Substrate fehlen. Werden bestimmte Zellen auf Laminin gesetzt, bewirkt dies die Stimulierung von Lamellipodien, auf Fibronectin ist zumeist die Formation von Fokalkontakten und Stressfasern verstärkt. Die verschiedenen Substrate haben auch Auswirkungen auf die Motilität der Zellen.

Die Deckgläser (12 mm) wurden mit 100  $\mu\text{l}$  Laminin (25  $\mu\text{g/ml}$ ) in Laminin – Puffer (150 mM NaCl/ 50 mM Tris) beschichtet. Fibronectin (Boehringer Mannheim) wird in einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  eingesetzt (in PBS). Da Fibronectin als Stammlösung (1mg/ml) in 2M Harnstoff gelöst wurde, wurden die Deckgläschen vor dem Aussäen der Zellen

mehrmals mit PBS gewaschen. Die Beschichtungen erfolgen in der Regel über einen Zeitraum von 1 h bei RT.

### **Indirekte Immunfluoreszenz**

Bei der indirekten Immunfluoreszenz fixierter Zellen erfolgt die Visualisierung der Proteine durch die Bindung eines primären Antikörpers, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sekundärantikörper sichtbar gemacht wird. Durch die Bindung mehrerer Sekundärantikörper an einem primären Antikörper wird eine hohe Sensitivität erreicht, deren Prinzip auch in quantitativen Methoden genutzt wird (z.B. ELISA).

Für die subzelluläre Lokalisation von Proteinen wurden die Zellen zunächst mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS, welches Proteine miteinander quervernetzt, 20 min. fixiert. Damit die Antikörper in die Zellen und die entsprechenden Kompartimente gelangen können, werden die Zellen mit einem Detergenz permeabilisiert. In dieser Arbeit wurde mit 0,1 % TritonX-100 in 4% PFA in PBS nicht länger als 1 min. permeabilisiert.

Der Extraktionsschritt mit 0,1% TX-100/PFA kann auch (je nach Antikörper) vor der Fixierung mit PFA durchgeführt werden. Danach erfolgt die Fixierung mit 4%PFA für 20 min.

### **DURCHFÜHRUNG DER FIXIERUNG UND ANTIKÖRPER-INKUBATION :**

Bei der Durchführung ist zu beachten, dass alle verwendeten Lösungen auf RT vorgewärmt sind. Die fixierten und extrahierten Zellen wurden mit 5% horse serum in 1% BSA/ PBS für 20 min. blockiert und kurz mit PBS gewaschen. Für die Immunfluoreszenz-Reaktion wurde auf die Innenseite eines Parafilmstückes 20 µl der Antikörperlösung pipettiert (Hybridomaüberstände wurden unverdünnt eingesetzt, aufgereinigte Antikörper entsprechend ihrer Konzentration in 1% BSA in PBS auf 10µg / ml verdünnt).

Das Deckgläschen wurde mit der Zelleseite nach unten auf die Antikörpertropfen gelegt. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde bei RT (oder ½ h, 37°C) in einer feuchten Kammer.

Überschüssige Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Dabei werden ca. 200µl PBS an den Rand der Deckgläser auf den Parafilm gegeben. Dies führt zu einem Aufschwimmen des Glasplättchens und damit zur Verhinderung von Scherkräften, die die Zellen beim Abheben vom Parafilm zerstören.

Es folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (1 h bei RT oder ½ h bei 37°C) und erneutes dreimaliges Waschen in PBS. Dem Sekundärantikörper wurde gegebenenfalls zusätzlich Phalloidin für die Färbung der Aktinfilamente in der entsprechenden Verdünnung

hinzugefügt (1:200 bzw. 1:400). Die Deckgläschen wurden mit der Zellseite nach unten auf einen Tropfen Mowiol plus 2,5 µg/ml n-Propylgalat (npg) auf einen Objektträger gelegt und 1 h bei 37°C getrocknet (oder über Nacht bei 4°C).

Für die Mikroskopie wurden die Proben in eine Objektträger-Halterung am Mikroskop eingespannt. Die Lagerung der Präparate erfolgt im Dunkeln bei 4°C.

Lösungen :

Fixierlösung : 4 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS, pH 7,5

Extraktionslösung: 0,1 % TritonX-100 in 4 % PFA in PBS

### 2.9.2 Fluoreszenzmikroskopie lebender Zellen

Zur Mikroskopie lebender Zellen wurde die Focht-Durchflußkammer verwendet. Die Deckgläschen mit den mit GFP-Fusionsproteinen transfizierten Zellen wurden in die Kammer eingespannt und die Kammer vorsichtig mit Observationsmedium (siehe Kapitel 2.4) luftblasenfrei befüllt. Die Kammer und das Objektiv wurden auf 37°C geheizt. Nachdem die Zellen sich an die Veränderungen adaptiert hatten, konnte mit der Aufnahme von Sequenzen oder Einzelbildern begonnen werden.

Für die Aufnahme von Einzelbildern wurden folgende Parameter festgelegt:

Auswahl des Shutter für Fluoreszenz- oder Phasenkontrast-Beleuchtung, Belichtungsstärke, Bildgröße und Länge der Belichtungszeit.

Für die Aufnahme von Sequenzen wurden zusätzliche Parameter eingestellt:

Anzahl der Einzelbilder, Möglichkeit der Kombination von Fluoreszenz- und Phasenkontrast-Aufnahmen und Zeit zwischen den Einzelaufnahmen.

### Phalloidin

Phalloidine sind Toxine des Knollenblätterpilzes *Amanita phalloides*. Sie lagern sich seitlich an die Aktinfilamente an und blockieren dadurch die Depolymerisation (Cooper, 1987).

Durch Fluoreszenzfarbstoffe, die an Phalloidin gekoppelt werden, können Aktinfilamente für die Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden. Es wurden eingesetzt:

- Phalloidin gekoppelt an Alexa Fluor<sup>TM</sup> 594 (Molecular Probes), Verdünnung 1:400 in 1% BSA in PBS
- Phalloidin gekoppelt an Alexa Fluor<sup>TM</sup> 488 (Molecular Probes), Verdünnung 1:200 in 1% BSA in PBS
- Phalloidin gekoppelt an Alexa Fluor<sup>TM</sup> 350 (Molecular Probes), Verdünnung 1:200 in 1% BSA in PBS

### 2.9.3 Spreading assay

Beim spreading assay wurden NIH3T3 Fibroblasten in einer Zellzahl von  $2 \times 10^4$  Zellen auf Fibronectin-beschichtete Glas-coverslips replattiert und zu bestimmten Zeitpunkten mit 4% PFA/PBS für 20min. fixiert. Anschliessend wurden die Zellen wie unter Punkt 2.8.1 beschrieben mit dem polyklonalen anti-PREL1 Antikörper 1-420 gefärbt.

Neben Immunfluoreszenzen wurden die Zellen für Quantifizierungen verwendet. Dafür wurden von den jedem Zeitpunkt - 10min., 20min., 40min., 60min. nach Replattierung- je 300 Zellen ausgezählt. Es wurden die Zellen berücksichtigt, die sich gerade ausbreiteten, die schon ausgebreitet waren und die, die eine Lokalisation von endogenem PREL1 an der lamellipodialen Spitze zeigten. Die statistische Auswertung erfolgte mit den Software Programmen Microsoft Excel 2001 und SigmaPlot 8.

### 2.9.4 Konfokale Mikroskopie

Immunfluoreszenzen mit dem polyklonalen PREL1 Antikörper 1-420 wurden neben dem inversen Mikroskop auch mit einem konfokalen Mikroskop betrachtet. Dabei handelt es sich um ein Konfokales Laser Scanning Mikroskop der Firma Zeiss (Jena, Deutschland). Die Bilder wurden mit einem Plan Neofluar Objektiv 100x / 1.3 oil und einem zweifach Zoom aufgenommen. Für eine optimale Ausnutzung der Laser-Wellenlängen wurde als Zweitantikörper ein Rhodamin-konjugierter Ziege-Anti-Kaninchen Antikörper verwendet. Die Anregungswellenlänge von Rhodamin liegt bei 434 nm.

## 2.10 Verwendete Antikörper

**Tabelle 1 : Verwendete primäre Antikörper**

ANTIKÖRPERBEZEICHNUNG	EINGESETZT (VERDÜNNUNG)	SUBKLASSE
$\alpha$ PREL1 1-420	affinitätsgereinigt, c= 2,3mg/ml WB 1:2500, IF 1:300	Polyklonaler Peptidantikörper
$\alpha$ PREL1 5505-12 (PREL1B)	affinitätsgereinigt; c = 0,56 mg/ml WB 1:500	Polyklonaler Peptidantikörper
$\alpha$ VASP 5500-5 (VASP-A)	affinitätsgereinigt, c=0,8mg/ml WB 1:2000, IF 1:300	Polyklonaler Peptidantikörper
$\alpha$ GFP 101G4B2	Affinitätsgereinigt, c= 1,5mg/ml WB 1:1000	IgG1
$\alpha$ Zyxin 164D4	Hybridomakulturüberstand (unverdünnt)	IgG1
$\alpha$ Zyxin 31C4	Hybridomakulturüberstand (unverdünnt)	IgM
$\alpha$ p16 323H3	Hybridomakulturüberstand (unverdünnt)	IgG1
$\alpha$ myc 9E10	affinitätsgereinigt, c=1,5 mg/ml WB 1:1000, IF 1:200	IgG1
$\alpha$ Vinculin hVin1 (Sigma)	WB 1:5000, IF 1:500	IgG1
$\alpha$ Mena 49C2B12	affinitätsgereinigt; c = 2,3 mg/ml WB 1:1500, IF 1:200	IgG1
$\alpha$ Nck1 (Transduction Laboratories)	WB 1:500	monoklonal
$\alpha$ Grb2 (Santa Cruz)	WB 1:100	polyklonal
$\alpha$ PY99 (Santa Cruz)	c= 200 $\mu$ g/ml WB 1:1000, IF 1:100	monoklonal
$\alpha$ Abl (Santa Cruz)	c= 200 $\mu$ g/ml WB 1:300	monoklonal
$\alpha$ Abi W8-3	Kulturüberstand WB 1:10, IF 1:300	monoklonal
$\alpha$ beta-Aktin AC-15/AC-74 (Sigma)	affinitätsgereinigt; c= 1,3mg/ml WB 1:1000, IF 1:100	monoklonal
$\alpha$ GST 280F6	Hybridomakulturüberstand; affinitätsgereinigt, c=0,5mg/ml WB 1:400	IgG1
$\alpha$ Evi 84H1	Hybridomakulturüberstand (unverdünnt)	IgG1

**Tabelle 2 : Verwendete sekundäre Antikörper**

BEZEICHNUNG	GEKOPPELT MIT / VERDÜNNUNG	FIRMA
Ziege anti Maus IgG & IgM (H+L)	Peroxidase / 1:2000 (Western Blot)	Dianova
Ziege anti Kaninchen IgG & IgM (H+L)	Peroxidase / 1:2000 (Western Blot)	Dianova
Ziege anti Maus IgG (H+L)	Alexa Fluor 488 / 1:200	MoBiTec (Molecular Probes)
Ziege anti Maus IgG (H+L)	Alexa Fluor 594 / 1 : 400	MoBiTec (Molecular Probes)
Ziege anti Kaninchen IgG (H+L)	Alexa Fluor 488 / 1:200	MoBiTec (Molecular Probes)
Ziege anti Kaninchen IgG (H+L)	Alexa Fluor 594 / 1:400	MoBiTec (Molecular Probes)
Ziege anti Maus IgG + IgM (H+L)	Rhodamin / 1:200	Dianova

## 2.11 Verwendete Konstrukte

**Tabelle 3: Konstrukte für bakterielle Expression**

NAME	INSERT	VEKTOR	VERWENDET IN
GST-prp48	humanes PREL1 1-420	pGEX-6P1	Antikörperherstellung
GST-PR-N prolinreicher N-Terminus	murines PREL1 1-252	pGEX-6P2	pull down
GST-PR-C prolinreicher C-Terminus	murines PREL1 398-668	pGEX-6P1	pull down
GST-RA Ras Assoziations Domäne	murines PREL1 151-276	pGEX-6P1	pull down
GST-RA-PH GM-Region	murines PREL1 151-433	pGEX-6P1	pull down
GST-PH Pleckstrin Homologie Domäne	murines PREL1 301-433	pGEX-6P3	Lipid overlay
GST-EVH1 VASP <sup>1</sup>	humanes VASP 1-149	pGEX-6P1	Peptid overlay pull down
GST-EVH1 Mena <sup>1</sup>	humanes Mena 1-112	pGEX-6P1	Peptid overlay pull down
GST-EVH1 Evl <sup>1</sup>	humanes EVL 1-153	pGEX-6P1	Peptid overlay pull down
GST-Grb2-SH3-N <sup>2</sup>	humanes Grb2 1-51	pGEX-6P1	pull down
GST-Grb2-SH3-N <sup>2</sup>	humanes Grb2 159-214	pGEX-6P1	pull down
GST-Nck1-SH3-1 <sup>2</sup>	humanes Nck1 1-63	pGEX-6P1	pull down
GST-Nck1-SH3-2 <sup>2</sup>	humanes Nck1 106-168	pGEX-6P1	pull down
GST-Nck1-SH3-3 <sup>2</sup>	humanes Nck1 189-257	pGEX-6P1	pull down
GST-V12Ras konstitutiv aktive Mutante	humanes H-Ras	pGEX-6P2	pull down Mikroinjektion
GST-V12Rap1A konstitutiv aktive Mutante	murines Rap1A	pGEX-6P1	pull down

<sup>1</sup> beschrieben in Carl et al 1999,

<sup>2</sup> zur Verfügung gestellt von A. Fabian, GBF Braunschweig

**Tabelle 4: Konstrukte für eukaryotische Expression**

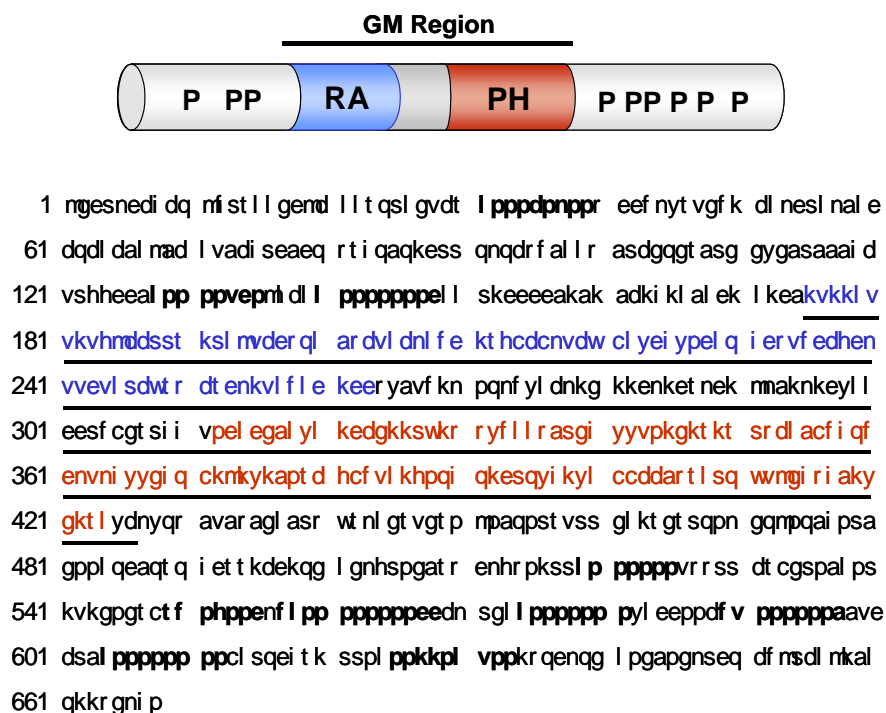
NAME	INSERT	VEKTOR	VERWENDET IN
PREL1	EST 14500382	pCMV-Sport6	Western Blot co-IP
GFP-PREL1	murines PREL1 1-668	pEGFP-C3	Video Mikroskopie Western Blot co-IP
PREL1-GFP	murines PREL1 1-668	pEGFP-N3	Video Mikroskopie
GFP-PR-N	murines PREL1	pEGFP-C2	co-IP pull down
GFP-PR-C	murines PREL1	pEGFP-C2	co-IP pull down
GFP-VASP <sup>1</sup>	humanes VASP (volle Länge)	pEGFP-N1	co-IP pull down
GFP-Grb2	(z.V.g. von M. Way, Cancer Research, London, UK)	GFP-C	Immunfluoreszenz
GFP-Nck1	(z.V.g. von M. Way, Cancer Research, London, UK)	GFP-C	Immunfluoreszenz
GFP-N-WASP	(z.V.g. von S. Lommel, GBF, Braunschweig)	GFP-C1/-C3	Immunfluoreszenz
myc-V12Ras	humanes H-Ras/K-Ras	pRK5-myc	co-IP
myc-Rap1A	murines Rap1A	pRK5-myc	co-IP

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 PREL1 gehört zu der Familie der Grb-Adaptoren

##### *Identifizierung und Domänenstruktur von PREL1*

Sequenzanalysen und Homologiesuchen in Datenbanken (BLAST, Basic Local Alignment Search Tool ) ergaben für die kodierende Sequenz des humanen PREL1 eine Größe von 1998 Basen, für die murine Sequenz eine Größe von 2007 Basen, die für ein Protein mit einem Molekulargewicht von 74 kDa kodieren. PREL1 hat in seinem N- und C-Terminus eine große Anzahl von prolinreichen Abschnitten. Neben diesen Regionen fand das Programm SMART (Simple Modular Architecture Research Tool) in der Aminosäuresequenz von PREL1 eine Ras-Assoziations (RA)-Domäne und eine Pleckstrin-Homologie (PH)-Domäne. Die RA Domäne definiert Effektoren der kleinen GTPase Ras, die PH Domäne definiert Lipid/Protein Bindungsflächen (siehe Abb. 3.1).



**Abbildung 3.1: Domänenstruktur und Aminosäuresequenz von murinem PREL1.** Das Modell der PREL1 Sequenz veranschaulicht die Domänenstruktur (oben). Unter dem Modell ist die Aminosäuresequenz des murinen PREL1 dargestellt. PREL1 weist in seiner Sequenz eine Ras-Assoziations-Domäne (blau) und eine Pleckstrin-Homologie-Domäne (rot) auf. Die prolinreichen Abschnitte (P) sind in fetter Schrift hervorgehoben. Die GM Region ist als schwarzer Strich dargestellt.

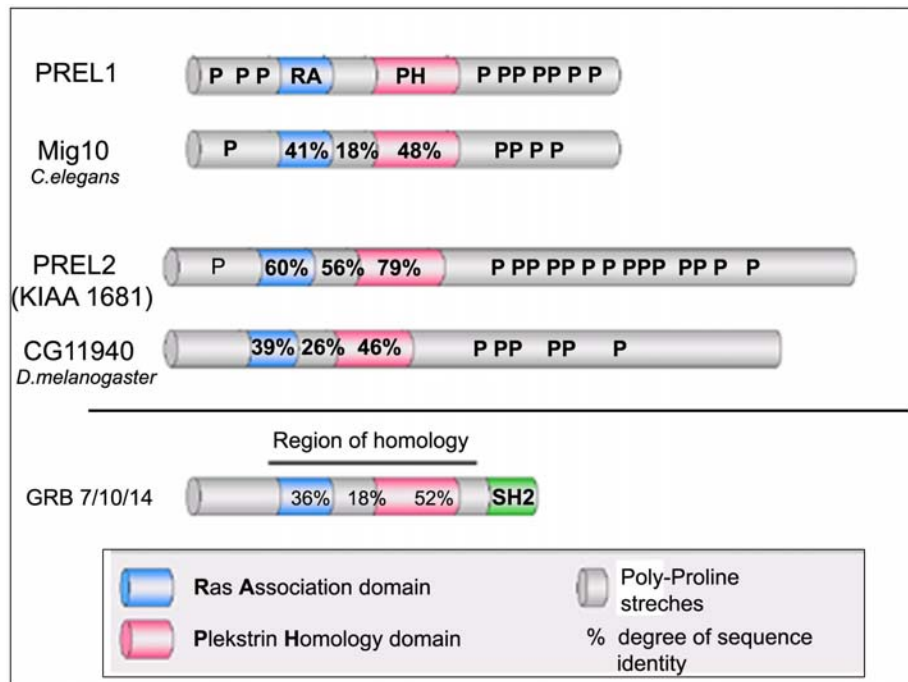
Die RA und die PH Domäne mit der dazwischenliegenden Region in PREL1 zeigen Homologien zu den Proteinen der Wachstumsfaktor Rezeptor Bindenden Proteinfamilie (Grb= Growth factor receptor bound) der Signal-Adaptoren. Diese Region der Sequenzhomologie von etwa 300 Aminosäuren wurde auch im *Caenorhabditis elegans* Protein MIG-10 gefunden und wurde GM Region (Grb7/10/14-Mig10 Homologie Region) genannt (Manser et al., 1997; Daly, 1998). MIG-10, das putative *C.elegans* Ortholog zu PREL1, ist in neuronaler Zellmigration während der Embryonalentwicklung des Nematoden involviert.

PREL1 und MIG-10 weisen im Gegensatz zu den Grb-Proteinen keine C-terminale SH2 Domäne auf, welche an Wachstumsfaktor-Rezeptoren bindet und Phosphotyrosin-Signale vermittelt. Stattdessen enthalten sie in den flankierenden Bereichen der Domänen eine Vielzahl von prolinreichen Abschnitten, die Oberflächen für Prolin-Erkennungsdomänen bieten (Abb. 3.2).

In Säugern gibt es zwei homologe Gene von PREL: PREL1, welches in dieser Arbeit charakterisiert wurde mit einem theoretischen MW von 74 kDa und KIAA1681 (welches vorläufig PREL2 genannt wird) mit einem berechneten MW von 135 kDa. PREL1 und PREL2 zeigen eine hohe Sequenzhomologie auch ausserhalb der GM Region, insbesondere im N-Terminus. Der größte Unterschied liegt in der Anzahl der C-terminalen prolinreichen Abschnitten, die in PREL2 um ein Vielfaches höher ist (Abb. 3.2 und 3.24).

Zu PREL2 konnte kein Ortholog in *C.elegans* gefunden werden, allerdings ergaben Sequenzanalysen, dass homologe Proteine in *Drosophila melanogaster* und in *Anopheles gambia* vorliegen, welche jedoch keine PREL1 Orthologe aufweisen.





**Abbildung 3.2: PREL1 gehört zu der Familie der Grb-Adaptor Proteine.**

PREL1 gehört aufgrund von Homologievergleichen zu einer Zwei-Gen Familie, die wegen der Domänenstruktur und Sequenzhomologien der Familie der Grb-Adaptoren zugewiesen wird. Den PREL-Proteinen fehlt im Gegensatz zu den Grb-Proteinen jedoch die C-terminale SH2 Domäne. Allerdings weisen PREL1 und PREL2 eine Vielzahl von prolinreichen Sequenzabschnitten zu beiden Seiten der Domänen auf. Die Prozentzahlen zeigen die Höhe der Homologien, **P** steht für Prolin. „Region of Homology“ definiert die GM Region und den Bereich der größten Übereinstimmung zwischen Grb-Proteinen und PREL.

## 3.2 Tools zur Charakterisierung von PREL1

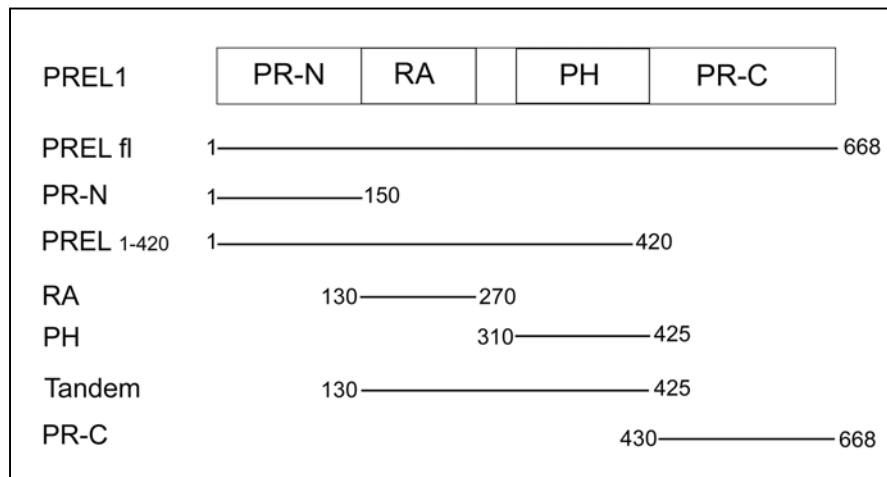
### 3.2.1 Herstellung von PREL1 Konstrukten

Für die Aufklärung der Funktion eines neuen, unbekannten Proteins wurden verschiedene Konstrukte hergestellt. Das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) Fusionskonstrukt wurde für Lokalisationstudien in eukaryotischen Zellen, die Glutathion-S-Transferase (GST) Fusionen für die Expression und Reinigung des Fusionsproteins in prokaryotischen Zellen verwendet. Die DNA-Sequenz des zu untersuchenden Proteins wurde vor oder hinter die Sequenz von GFP oder GST kloniert, die in geeigneten Expressionsvektoren vorliegen (Amersham, Clontech) (siehe Kap. 2.5.1).

Für die Klonierung der gesamten PREL1 Sequenz, wurde ein muriner EST Klon (IMAGE ID 5009113, RZPD, Berlin) verwendet. Der EST Klon von PREL1 lag mit den Restriktionsschnittstellen NotI/SalI in einem eukaryotischen Expressionsvektor pCMV-Sport6 vor. Zuerst wurde der EST Klon sequenziert, um die enthaltene Sequenz zu überprüfen und um Kontaminationen mit anderen EST-Klonen auszuschliessen. Die PREL1- Sequenz wurde

anschliessend in GFP-Expressionsvektoren (siehe Tab. 4) kloniert und durch Sequenzierung der Leserahmen überprüft.

Für die Herstellung der Teil-Konstrukte wurden sequenzspezifische Primer verwendet und die Fragmente mittels PCR amplifiziert oder es wurden interne Restriktionsschnittstellen benutzt. Der EST Klon von PREL1 diente hier als Matrix. Die so erhaltenen Konstrukte wurden dann in die entsprechenden GST- oder GFP-Vektoren kloniert und sequenziert (siehe Abb. 3.3).



**Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte.**

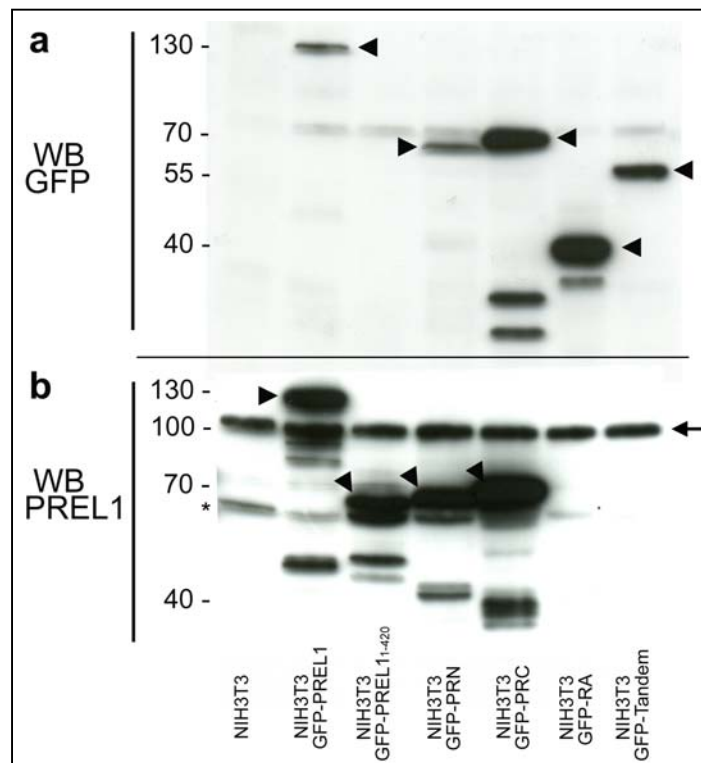
Der EST Klon (Image ID 5009113) von RZPD diente hier als Vorlage zur Herstellung der GFP- und GST-Konstrukte. PREL fl wurde direkt aus dem EST Klon herausgeschnitten, die Teilkonstrukte wurden mittels PCR mit dem EST Klon als template amplifiziert. Die Konstrukte wurden dann in GST- oder GFP-Expressionsvektoren kloniert (s. Tab. 3 und 4). Die Längen sind in Aminosäuren dargestellt. PR-N, prolinreicher N-Terminus; PR-C, prolinreicher C-Terminus; RA, Ras-Assoziations-Domäne; PH, Pleckstrin-Homologie-Domäne.

### *PREL1 in Fusion mit GFP*

Für Lokalisationsstudien von PREL1 und den verschiedenen Teilkonstrukten in Fusion mit GFP, wurden verschiedene Zelllinien mit Transfektionsreagenzien und der jeweiligen DNA transfiziert (siehe 2.8.3). Nach Expression des GFP-Konstruktes wurden die Zellen entweder auf Glass-coverslips replattiert oder zu Zellextrakten verarbeitet. Die Überprüfung des Molekulargewichtes der GFP-Konstrukte erfolgte über SDS-PAGE und Western Blot Analysen unter Verwendung eines monoklonalen anti-GFP-Antikörpers (101G4B2).

Western Blot Analysen mit dem GFP-Antikörper zeigten die Expressionsstärke der GFP-Konstrukte in den transfizierten Zelllinien und das Molekulargewicht (MW) der einzelnen Konstrukte (siehe Abb. 3.4). PREL1 hat ein apparentes MW von 100 kDa, GFP hat ein MW von 27 kDa. Zusammen wird GFP-PREL1 bei einem MW von ca. 130 kDa detektiert. Die prolinreichen Sequenzen von PREL1 in Fusion mit GFP haben ein MW von ca. 70 kDa, die RA Domäne plus GFP wird bei 40 kDa, das Tandem aus RA und PH Domäne wird bei 55

kDa detektiert. Das Konstrukt, welches die ersten 420 AS von PREL1 umfasst, hat ein apparentes MW von ca. 70 kDa.



**Abbildung 3.4: Expression der GFP-Konstrukte von PREL1 in NIH3T3 Zellen.**

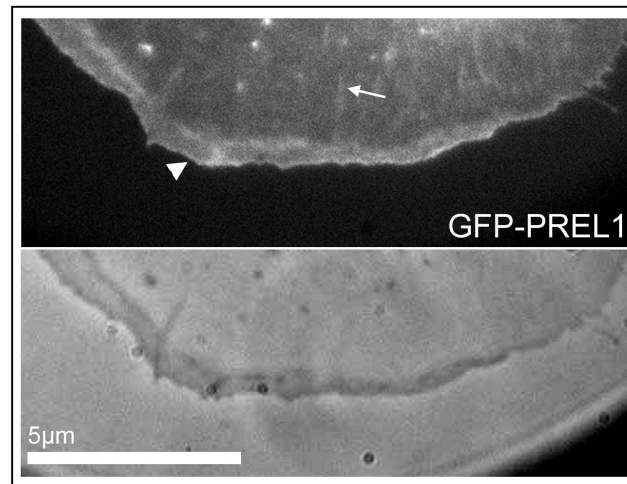
Ein Western Blot (WB) inkubiert mit einem monoklonalen GFP-Antikörper (101G4B2, **a**) und einem polyklonalen PREL1 Antikörper (5505-12, **b**) zeigt die Expressionsstärke der transfizierten GFP-Konstrukte (Pfeilspitzen) und des endogenen Proteins PREL1 (Pfeil) in NIH3T3 Fibroblasten. Der GFP Antikörper zeigt eine Kreuzreaktion auf 70 kDa und erkennt, wahrscheinlich wegen einer zu geringen Expressionsrate, das GFP-PREL<sub>1-420</sub> Konstrukt nicht. Der PREL1 Antikörper (**b**) erkennt nicht die RA Domäne plus GFP und das Tandem-Konstrukt mit GFP, da das Peptid-Epitop ausserhalb dieser Domänen liegt (s. 2.7.3). Zusätzlich hat der Antikörper eine Kreuzreaktion auf 65kDa (Stern). Die Molekulargewichte des Markers sind in kDa angegeben.

Nach der Überprüfung der Expression der GFP-Konstrukte in eukaryotischen Zellen mit Hilfe des Western Blots, erfolgten Lokalisationsstudien in lebenden und fixierten Zellen, die mit den beschriebenen Konstrukten transfiziert worden waren.

In B16F1 Zellen auf Laminin, die das Volllängenprotein PREL1 in Fusion an GFP exprimieren, konnte beobachtet werden, dass PREL1 an der Spitze der Lamellipodien von sich ausbreitenden Zellen und etwas schwächer auch in Fokalkontakten lokalisiert (siehe Abb. 3.5).

Transfiziert man B16F1 Zellen mit dem prolinreichen N- oder C-Terminus oder der RA Domäne bzw. der RA und PH Domäne als Tandem in Fusion mit GFP, konnte keine spezifische Lokalisation der Fusionsproteine detektiert werden im Vergleich zum Gesamtprotein (nicht gezeigt), obwohl alle Konstrukte in den Zellen in der richtigen Größe

exprimiert werden und nahezu keine Degradation vorliegt (siehe Abb. 3.4). GFP-PREL1<sub>1-420</sub> zeigte in REF (Ratten-Embryonalfibroblasten) Zellen nur eine schwache Lokalisation in Fokalkontakten, in B16F1 Zellen konnte keine Lokalisation detektiert werden.



**Abbildung 3.5: Lokalisation von GFP-PREL1 in B16F1 Zellen auf Laminin.**

Transfizierte B16F1 Zellen auf Laminin zeigen eine Lokalisation von GFP-PREL1 an der Spitze von Lamellipodien (Pfeilspitze) und schwach in Fokalkontakten (Pfeil). Das untere Bild zeigt die korrespondierende Phasenkontrastaufnahme der selben Zelle. Der Balken entspricht einer Größe von 5µm.

#### *PREL1 in Fusion mit GST*

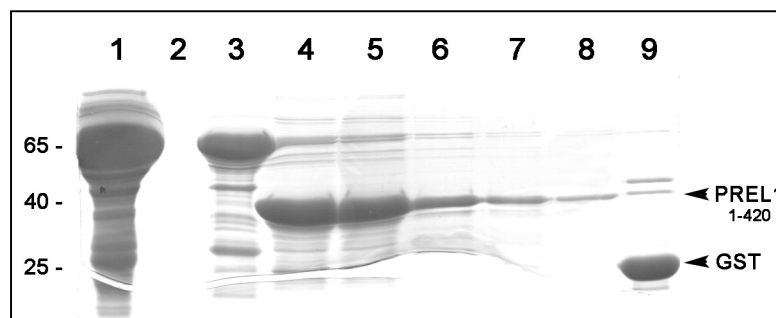
Für *in vitro* Analysen („pull downs“ und Lipid-Overlays) wurden Teilstücke von PREL1 als GST-Fusionsproteine in *E.coli* hergestellt. PREL1<sub>1-420</sub> lag schon im pGEX Vektor vor (Dissertation B. Behrendt), der prolinreiche N- und C-Terminus, sowie die RA Domäne, das Tandem und die PH Domäne wurden in dieser Arbeit hergestellt. Die Expression der Konstrukte in *E.coli* und die Intaktheit der Fusionsproteine wurde über SDS-PAGE analysiert (siehe 2.6.2). Auf dem Gel wurden Proben von Bakterien vor und nach Induktion mit IPTG und vor und nach Bindung der entsprechenden Fusionsproteine an Glutathion-Sepharose aufgetragen.

Für die Immunisierung und die Herstellung der polyklonalen Antikörper wurde der GST-Anteil vom Protein abgeschnitten (siehe Abb. 3.6). Bei den „pull downs“ wurde das Fusionsprotein am Säulenmaterial belassen. Für die Overlays verblieb der „tag“ am Protein, welches durch Konkurrenz mit GSH vom Säulenmaterial eluiert wurde (siehe 2.6.3). GST diente bei den Overlays zum Nachweis, da mit einem GST Antikörper die Expression und eine mögliche Bindung gezeigt werden kann.

Die AS 1-420 von PREL1 als GST-Fusionsprotein wurden durch Affinitätschromatographie über eine Glutathion–Sepharose-Säule aus den Bakterien gereinigt (siehe Abb. 3.6 und Kapitel 2.6.3). Das Fusionsprotein-enthaltende klare Lysat wurde direkt auf die Säule gegeben. Nach der Bindung des Fusionsproteins an die Säulenmatrix wurde mit PBS gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Das gebundene GST-PREL1<sub>1-420</sub> Fusionsprotein wurde anschließend mit der PreScission-Protease vom GST geschnitten. Es wurden Proben des Säulenmaterials nach der Kopplung des Fusionsproteins (Spur 1), der gewaschenen Säule mit dem gekoppelten GST-Fusionsprotein (Spur 3), der Fraktionen nach dem Verdau mit der Protease (Spuren 4-8) und als Kontrolle das Säulenmaterial mit dem noch gekoppelten GST (Spur 9) im SDS-Gel untersucht.

Abbildung 3.6 zeigt das Coomassie-gefärbte SDS-Gel. Nach dem Waschvorgang sind fast alle unspezifisch gebundenen Proteine entfernt worden und nach dem Verdau mit der Protease lag das gereinigte Protein ohne GST vor (Spuren 4 – 8). PREL1<sub>1-420</sub> zeigt nach dem Verdau mit der Protease im SDS-Gel ein MW von 40 kDa.

Die Fraktionen mit dem gereinigten Protein wurden vereinigt, durch photometrische Messung die Konzentration bestimmt und die erhaltene Menge berechnet. So konnten aus 750 ml Bakterienkultur 6,6 mg Protein gereinigt werden ( $c = 0,83 \text{ mg/ml}$ ). Das so aufgereinigte Protein wurde dann für die Herstellung polyklonaler Antikörper und diese für die anschließenden biochemischen Methoden verwendet.



**Abbildung 3.6: Herstellung von PREL1<sub>1-420</sub> als GST-Fusionsprotein.** Die Abbildung zeigt ein 12%iges SDS-Gel mit Proben des Säulenmaterials nach der Kopplung mit dem Fusionsprotein (Spur 1), Durchlauf nach Waschen der Säule (Spur 2), Säulenmaterial nach Waschen der Säule mit gebundenem Fusionsprotein (Spur 3) und Fraktionen nach der Spaltung mit der Protease (Spuren 4-8), sowie Säulenmaterial nach der Elution (Spur 9). Das aufgereinigte PREL1<sub>1-420</sub> hat ein MW von 40 kDa, GST ein MW von 27 kDa. Die MW des Markers ist in kDa angegeben.

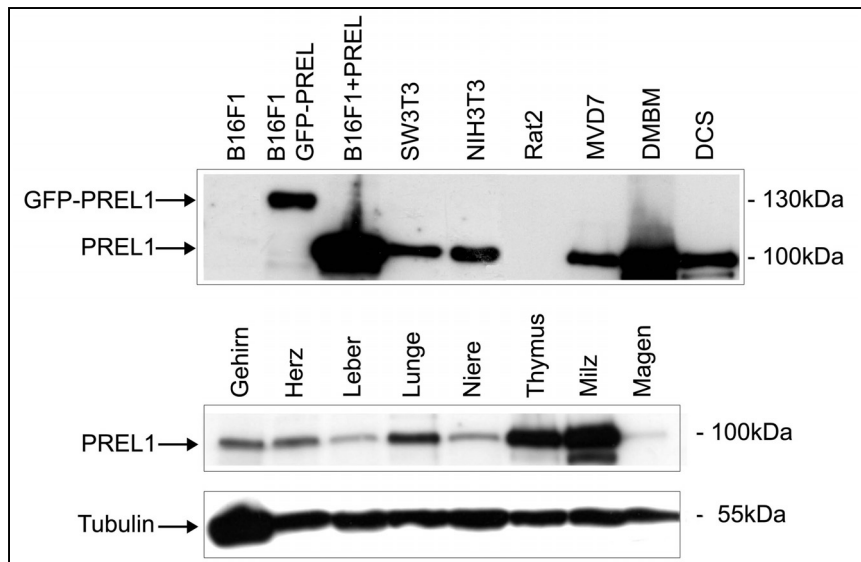
### 3.2.2 Polyklonale Antikörper gegen PREL1

Für eine detaillierte Analyse von PREL1 wurden polyklonale Antikörper in Kaninchen generiert. Die Herstellung monoklonaler Antikörper wurde zweimal versucht, führte aber zu

keinem befriedigendem Ergebnis. Für die Immunisierung wurde zum einen der N-Terminus von PREL1 AS 1-420 (siehe Abb. 3.6) und zum anderen PREL1-spezifische Peptide verwendet.

Die ausgewählten Peptide (PREL1A, PREL1B und PREL1C, siehe Kapitel 2.7.3) wurden mit Hilfe eines Algorithmus mit der GeneRunner Software ausgewählt, die die Oberflächenwahrscheinlichkeit und hydrophilen wie auch immunogenen Eigenschaften vorhersagt. Diese wurden dann von R. Frank (GBF, Braunschweig) synthetisiert. Die Peptide wurden wie in Kapitel 2.7.3 beschrieben an KLH gekoppelt und für die Immunisierung eingesetzt. Die Immunisierungen wurden von den Firmen BioGenes (Berlin) oder Biogentech (Belgien) durchgeführt. Nach der Immunisierung wurden die Seren, die die generierten polyklonalen Antikörper enthielten, auf ihre Spezifität getestet. Die Affinitätsreinigung erfolgte für die Seren mit den höchsten Titern wie unter 2.7.4 beschrieben. Darauf wurden die gereinigten Antikörper im Western Blot und in der Immunfluoreszenz charakterisiert.

Der polyklonale Antikörper gegen die AS 1-420 von PREL1 erkannte im Western Blot spezifisch endogenes PREL1 in Zellextrakten von verschiedenen Zelllinien, sowie ektopisch exprimiertes PREL1 und das GFP-Fusionsprotein (Abb. 3.7, obere Reihe). PREL1 hat ein apparentes MW von 100 kDa, GFP-PREL1 von 130 kDa. Western Blot Analysen von unterschiedlichen Organen aus der Maus zeigten die fast ubiquitäre Expression von PREL1 und eine signifikante Anreicherung im haematopoetischen System (hier Thymus und Milz; Abb. 3.7, mittlere Reihe). Als Ladekontrolle diente ein anti-Tubulin Antikörper, um sicherzustellen, dass von jedem Organextrakt die gleiche Menge aufgetragen worden war (Abb. 3.7, untere Reihe). Da die Tubulin-Expression im Gehirn höher ist, ist das Signal dort stärker als in den anderen Organen.



**Abbildung 3.7: Western Blot Analyse des polyklonalen anti-PREL1 Antikörpers 1-420.**

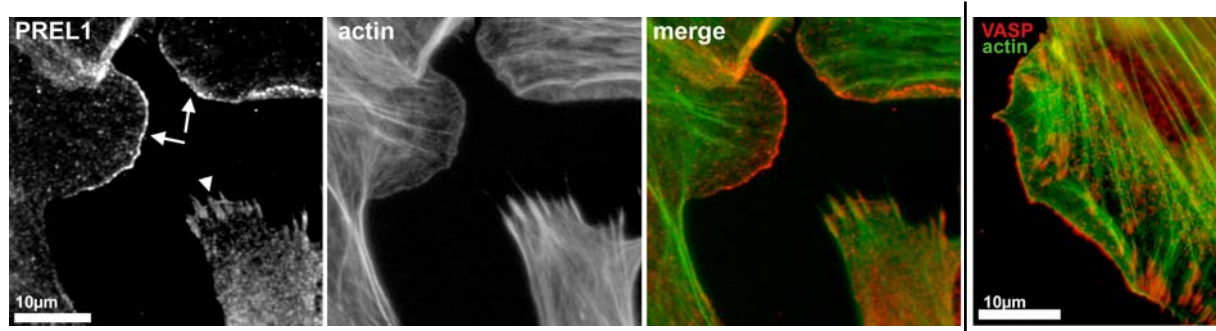
Der polyklonale Antikörper gegen die AS 1-420 von PREL1 erkennt im Western Blot auf verschiedenen Zellextrakten endogenes PREL1 (100 kDa), sowie das GFP-Konstrukt (130 kDa) und ektopisch exprimiertes PREL1 (obere Abb.). Die fast ubiquitäre Expression von PREL1 zeigt sich in verschiedenen Organextrakten (mittlere Abb.), eine Anreicherung des Proteins im haematopoetischen System ist zu erkennen (Thymus, Milz). Als Ladekontrolle diente ein anti-Tubulin Antikörper (untere Abb.). DMBM = humane Makrophagen, DCS = Dendritische Zellen.

Zur weiteren Charakterisierung des erhaltenen Antikörpers wurden Immunfluoreszenzen in verschiedenen Zelllinien durchgeführt. Dazu wurden die Zellen auf verschiedene Substrate replattiert und mit 4%PFA fixiert. Für den PREL1 Antikörper 1-420 ergab sich nach verschiedenen Tests die beste Färbung, wenn erst eine Vorextraktion der Zellen mit Triton X-100/PFA und anschliessend die Fixierung mit PFA erfolgte.

In SW3T3 Zellen auf Fibronectin (Abb. 3.8) färbte der polyklonale PREL1 Antikörper 1-420 die lamellipodiale Spitze von migrierenden Zellen und zusätzlich Fokalkontakte, was der Lokalisation des Proteins als GFP-Konstrukt in B16F1 Zellen entspricht (siehe Abb. 3.5).

In sich ausbreitenden NIH3T3 Zellen auf Fibronectin kann mit diesem Antikörper ebenfalls eine Färbung der lamellipodialen Spitze beobachtet werden (siehe Abb. 3.17, b).

Immunfluoreszenzen mit einem Antikörper gegen das Ena/VASP Familienmitglied VASP zeigen eine ähnliche Verteilung (siehe Abb.3.8, rechtes Bild).



**Abbildung 3.8: Immunfluoreszenzen des polyklonalen PREL1 Antikörpers 1-420.**

Der polyklonale PREL1 Antikörper 1-420 zeigt in SW3T3 Zellen auf Fibronektin eine Färbung der lamellipodalen Spitze (Pfeile) in migrierenden Zellen und von Fokalkontakten (Pfeilspitze) in adhätierenden Zellen. In der Mitte ist die korrespondierende Färbung des Aktinzytoskeletts durch Alexa488-konjugiertes Phalloidin zu sehen. Das rechte Bild zeigt die übereinandergelegten Bilder (merge). Überlagernde Strukturen erscheinen gelb. Das Bild ganz rechts zeigt eine Färbung mit dem polyklonalen VASP Antikörper 5500-5, im Vergleich zu der PREL1 Färbung. In rot ist VASP dargestellt, in grün das Aktinzytoskelett. Die Balken entsprechen einer Größe von 10µm.

Im Western Blot zeigten die Peptid-Antikörper 5505-12 (PREL1B) und 5505-13 (PREL1C) eine Spezifität für PREL1 und das GFP-Konstrukt von PREL1 (siehe Abb. 3.9), vergleichbar mit dem anti-PREL1 1-420 Antikörper. Auch hier zeigt sich eine Kreuzreaktion auf ca. 65kDa, die allerdings etwas schwächer ist als mit dem PREL1-Antikörper 1-420. In der Immunfluoreszenz zeigten die Peptid-Antikörper keine spezifische Färbung, was mit der Zugänglichkeit des Epitops (Peptids) im nativen Protein zusammen hängen kann.

Die Western Blot Analysen mit den polyklonalen Peptid-Antikörpern gegen PREL1 verdeutlichen die Expression des Proteins in Fibroblasten-Zelllinien und in den haematopoetischen Makrophagen DMBM (vergleiche Abb. 3.7).



**Abbildung 3.9: Western Blot Analyse der polyklonalen Peptid-Antikörper 5505-12 und 5505-13 auf Zellextrakten.** Die affinitätsgereinigten Antikörper gegen PREL1 5505-12 (PREL1B) und 5505-13 (PREL1C) erkennen im Western Blot auf verschiedenen Zellextrakten endogenes PREL1 auf 100 kDa und GFP-PREL1 auf 130 kDa. B16F1 Zellen exprimieren kein endogenes PREL1.



### 3.2.3 Northern Blot Analyse

Neben der Analyse auf Proteinebene sollte die Expression von PREL1 auch auf RNA-Ebene untersucht werden. Der Northern Blot gibt Aufschluss darüber, in welchen Geweben/Organen das zu untersuchende Protein exprimiert wird, welche Größe das Transkript (mRNA = messenger RNA) hat und ob von dem Protein Spleißvarianten in den Zellen vorliegen.

Für die Ermittlung der Transkript-Größe eines Proteins, isoliert man mRNA oder Gesamt-RNA aus verschiedenen Organen oder Zellkultur-Zelllinien, trennt diese elektrophoretisch nach Größe im Agarosegel auf und blottet sie auf positiv geladene Membranen (z.B. Hybond N<sup>+</sup>). Man kann aber auch Northern Blots kommerziell erwerben, bei denen in der Regel mRNA aufgetrennt wurde. Diese müssen dann lediglich mit der entsprechenden Sonde hybridisiert und mit einem geeigneten System entwickelt werden.

In dieser Arbeit wurde zum einen ein kommerzieller Northern Blot mit humaner mRNA aus verschiedenen Organen verwendet (Amersham) und zum anderen ein Northern Blot mit Maus RNA selber hergestellt (siehe 2.5.17).

Die verschiedenen Blots wurden mit jeweils drei unterschiedlichen RNA-Sonden, die mittels des DIG-Labeling Systems (Roche) markiert waren, hybridisiert.

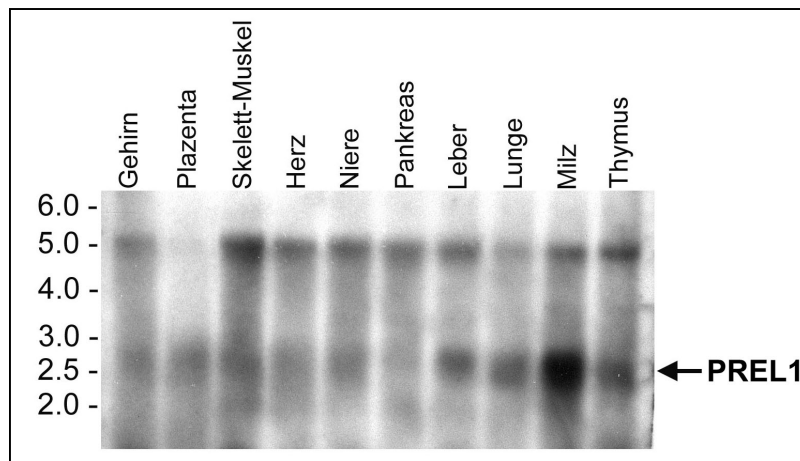
Nach der Entwicklung mit Chemilumineszenz (CDP Star, Roche) und Exposition auf einen Röntgenfilm (Amersham), wurde mit einer Sonde, die die ersten 750 bp von PREL1 umfasste, ein Signal bei 2,7 kB in Lunge, Leber, Milz und Thymus auf dem humanen mRNA-Blot von Amersham detektiert (siehe Abb. 3.10). Der Blot zeigt, dass die mRNA von PREL1 in haematopoetischen Organen hoch exprimiert wird und keine Spleißvarianten aufweist.

Dieses Ergebnis deckt sich mit denen aus den Western Blots, wo ebenfalls eine Anreicherung im haematopoetischen System zu sehen war.

Neben diesem Signal zeigt sich ein weiteres bei ca. 5,0 kB in allen Organen und mit allen verwendeten Sonden auf jedem Northern Blot (nicht gezeigt).

Diese Größe des Transkripts passt nicht zu der, die in den Datenbanken zu finden ist und stimmt auch nicht mit den Ergebnissen einer anderen Arbeitsgruppe überein, wo die mRNA von PREL1 auch bei einer Größe von 2,7 kb detektiert worden war (Inagaki et al., 2003).

Welche mRNA dem MW von 5,0 kB entspricht ist nicht klar, es könnte sich hier um unspezifische Kreuzreaktionen handeln, die mit stringenterem Waschen evtl. nicht mehr auftreten.



**Abbildung 3.10: PREL1 ist hochexprimiert im haematopoetischen System.**

Northern Blot Analysen auf humaner mRNA (Ambion) zeigen, dass die PREL1 messenger RNA eine Größe von ca. 2,7 kB hat. Die verwendete Sonde umfasst die Basen 1-750 des humanen PREL1. Es sind Signale in den Organen Leber, Lunge, Milz und Thymus zu erkennen. Eine Anreicherung im haematopoetischen System ist deutlich. Die Größen des Markers sind in kiloBasen (kB) angegeben.

### 3.3 Identifizierung von PREL1-Bindungspartnern anhand der Domänenstruktur

#### 3.3.1 Prolinreiche Sequenzen in PREL1 binden an EVH1 und SH3 Domänen

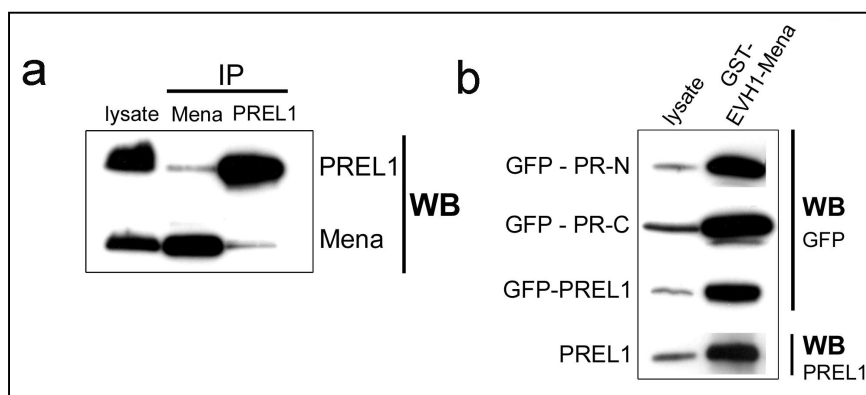
Proline dienen als Interaktionsoberflächen für Prolin-Erkennungs Domänen. Die am besten charakterisierten sind die Ena/VASP Homologie Domäne 1(EVH1) der Ena/VASP Proteine, die Src Homologie 3 (SH3) Domänen verschiedener Adaptor Proteine wie Nck1 oder Grb2 oder WW (Tryptophan/Tryptophan) Domänen aus z.B. FE65. Dabei erkennen diese Domänen verschiedene Konsensusmotive, die in der Anzahl der Proline und den flankierenden Aminosäuren variieren.

PREL1 hat in seinem N-und C-Terminus eine hohe Anzahl an prolinreichen Sequenzen, die laut Datenbankanalysen, Interaktionsoberflächen für verschiedene Prolin-Erkennungs Domänen bieten können. Aufgrund der Koloalisation mit Ena/VASP Proteinen und der Art der Identifizierung von PREL1 wurde zunächst untersucht, ob PREL1 *in vivo* und *in vitro* an die EVH1 Domäne der Ena/VASP Proteine binden kann.

#### *PREL1 bindet an die EVH1 Domäne von Ena/VASP Proteinen*

Für *in vivo* Analysen wurden Immunpräzipitationen mit Zelllysaten von Rat2 Zellen, die mit ungetagtem PREL1 transfiziert worden waren, verwendet. Die Lysate wurden mit einem monoklonalen Mena Antikörper (49C2B12) und dem polyklonalen PREL1 Antikörper 1-420 inkubiert. Es konnte gezeigt werden, dass das Ena/VASP Familienmitglied Mena PREL1 kopräzipitierte und der anti-PREL1 Antikörper endogenes Mena kopräzipitierte. Dies deutet

darauf hin, dass zumindest ein Anteil von Mena und PREL1 *in vivo* aneinander binden (Abb. 3.11, a). Um herauszufinden, ob diese Interaktion direkt ist und ob eine EVH1/Polyprolin-Interaktion für die Bindung von PREL1 an Mena und VASP verantwortlich ist, wie die Vorhersage für die PREL1 Sequenz andeutet, wurden ‚pull down‘ Experimente mit der EVH1 Domäne der Ena/VASP Proteine in Fusion mit GST durchgeführt. Dazu wurden Lysate von Zellen verwendet, die verschiedene GFP-Konstrukte des prolinreichen N- und C-Terminus und die volle Länge von PREL1 exprimieren. In diesen ‚pull downs‘ konnten signifikante Mengen des N- und C-Terminus in Fusion mit GFP und auch das endogene Volllängenprotein oder das ektopisch exprimierte Protein als GFP-Fusionsprotein aus Zelllysaten präzipitiert werden (Abb. 3.11, b).



**Abbildung 3.11: PREL1 bindet an die EVH1 Domäne von Mena.**

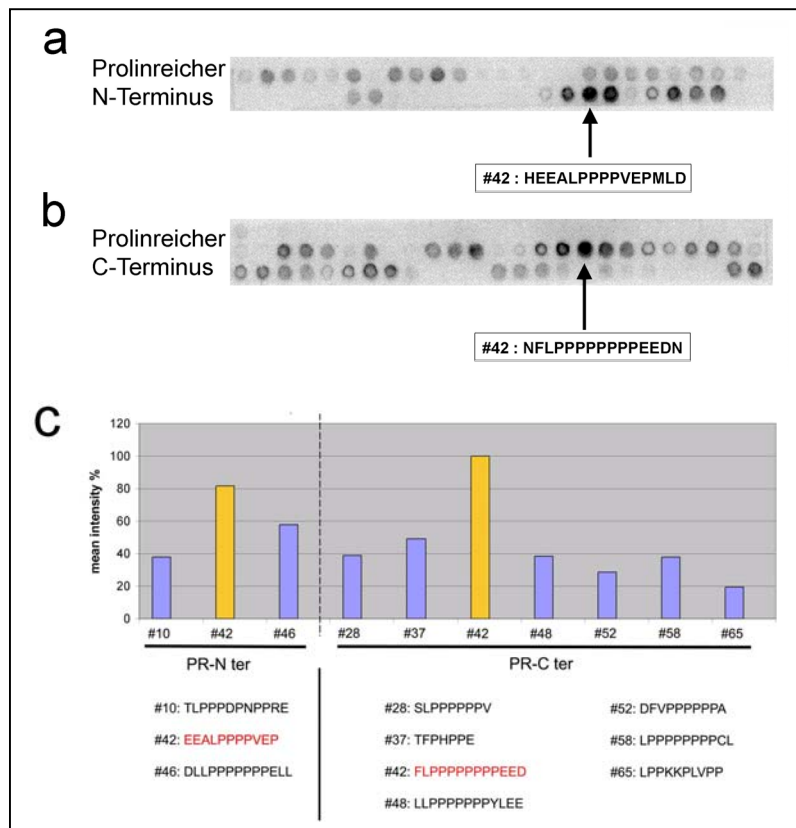
(a) Immunpräzipitationen (IP) mit dem polyklonalen PREL1 Antikörper 1-420 zeigen eine Bindung von PREL1 an Mena, der monoklonale Mena Antikörper (49C2B12) präzipitiert PREL1 aus Lysaten von Rat2 Zellen. Die Western Blots (WB) wurden zum Nachweis einer Bindung mit den für die IP verwendeten Antikörpern inkubiert. (b) Die EVH1 Domäne von Mena in Fusion mit GST präzipitiert aus Lysaten von NIH3T3 Zellen, die den prolinreichen N- (PR-N) oder C-Terminus (PR-C) als GFP Fusionsprotein exprimieren, beide Fusionsproteine gleich stark. Auch das GFP-markierte PREL1 Volllängenprotein und endogenes PREL1 werden von der Domäne präzipitiert.

In den Immunpräzipitationen und den ‚pull downs‘ mit der EVH1 Domäne von Mena konnte eine Bindung von PREL1 an Mena gezeigt werden.

Um zu bestimmen an welche Motive die EVH1 Domäne der Ena/VASP Proteine in PREL1 bindet, wurden die N-terminalen (AS 1-159) bzw. die C-terminalen prolinreichen Regionen (AS 433-668) aus PREL1 in einem Peptid-Scan auf Membranen in einer Anordnung von 15er- Peptiden gespottet, die in dem vorherigen und nachfolgenden Spot in 12 AS überlappen und mit der EVH1 Domäne von Mena (Abb. 3.12), VASP und Evl (nicht gezeigt) in Fusion mit GST inkubiert. Nach Entwicklung mit einem GST-Antikörper (280F6) und der Evaluation der Signalstärke der erhaltenen Reaktionen mittels CCD-Kamera (Fujifilm), wurde deutlich, dass die rekombinante GST-EVH1 Domäne von Mena über zwei Motive an PREL1 binden

kann. Ein Motiv liegt im N-Terminus (Box in 3.12, a), das andere im C-Terminus (Box in 3.12, b). Die Quantifizierung der Signalstärke durch ein Computerprogramm (AIDA Image Analyzer v3.21) verdeutlichte, dass diese Motive im N- und im C-Terminus die stärksten Bindungen aufwiesen. Die EVH1 Domäne bindet unter diesen *in vitro* Bedingungen zwar auch an die anderen Prolin-Motive in PREL1, allerdings mit geringerer Affinität im Vergleich zu den beiden hervorgehobenen Motiven. Das Diagramm in der Abbildung 3.12, c veranschaulicht die Intensitäten der Signale auf den Peptid-Scans.

Zusätzlich wird deutlich, dass die Bindung der EVH1 Domäne an das Motiv im N-Terminus niedriger ist als an den C-Terminus, welches am besten dem vorhergesagten Konsensus D/E-FPPPP-XD/E der EVH1 Domäne folgt. Somit konnte nicht nur eine Bindung von PREL1 an Ena/VASP Proteine (Mena) gezeigt, sondern auch die Bindungsmotive der EVH1 Domäne in der PREL1 Sequenz bestimmt werden.



**Abbildung 3.12: PREL1 bindet über zwei Motive die EVH1 Domäne von Mena.** Die N-terminalen (a) und C-terminalen (b) prolinreichen Sequenzen von PREL1 sind auf einen Peptid-Scan immobilisiert und mit der EVH1 Domäne von Mena in Fusion mit GST inkubiert worden. Die Spots mit den stärksten Signalen sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die Aminosäuresequenzen der am besten erkannten Spots sind in den Boxen aufgeschlüsselt. (c) zeigt die Evaluation der Bindungsstärke der EVH1 Domäne von Mena an die prolinreichen Sequenzen in PREL1. Die Nummern repräsentieren die Spots auf den Peptid-Scans mit der entsprechenden AS-Sequenz. Die rot dargestellten Aminosäuresequenzen repräsentieren die am stärksten erkannten Spots und sind gelb im Säulendiagramm. Der Wert mit der höchsten Intensität wurde auf 100 gesetzt.

*Der prolinreiche N-und C-Terminus von PREL1 bindet neben EVH1 Domänen auch Proteine mit SH3 Domänen*

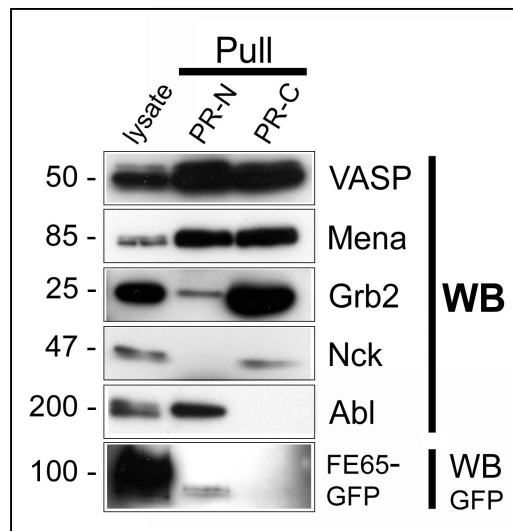
PREL1 hat in seinem N-und C-Terminus neben den Bindungsmotiven für die EVH1 Domäne weitere Konsensusmotive für SH3 und WW Domänen. In ‚pull down‘ Experimenten mit den prolinreichen Abschnitten von PREL1 sollte untersucht werden, ob Ena/VASP Proteine über den N-und C-Terminus gleichermaßen präzipitiert werden und ob auch Proteine mit SH3 Domänen wie Grb2, Nck1 und Abl präzipitiert werden können, da für diese SH3 Domänen Konsensusmotive in PREL1 vorliegen. Dazu wurden der prolinreiche N-und C-Terminus von PREL1 in Fusion mit GST mit Lysaten verschiedener Zelllinien inkubiert.

Ena/VASP Proteine konnten sowohl mit dem N- als auch mit dem C-Terminus im vergleichbaren Ausmaß präzipitiert werden, was den Befund der Peptid-Scans, die Bindungsstellen im N-und C-Terminus nahe legten, unterstützt. Des weiteren konnte über den prolinreichen C-Terminus von PREL1 das SH2/SH3 Adaptor Protein Grb2 präzipitiert werden. Die schwächere Bindung zu dem N-terminalen Teil von PREL1 deutet auf eine indirekte Interaktion hin, da es zu keiner Anreicherung kam (siehe Abb. 3.13).

Ausschließlich über den C-Terminus wurde in geringen Mengen Nck1 präzipitiert, ein weiteres SH2/SH3 Adaptor Protein. Die Abelson Tyrosin Kinase (Abl) wurde hingegen nur über den prolinreichen N-Terminus kopräzipitiert (Abb.3.13).

Obwohl für die Proteine Grb2, Nck und Abl Konsensusmotive, also potentielle Bindungsstellen, in PREL1 vorliegen, ist durch dieses Experiment nicht eindeutig nachgewiesen, ob eine direkte oder indirekte Bindung zu diesen Proteinen besteht.

Eine etwas schwächere Bindung - im Vergleich zu den oben genannten Proteinen - zeigte das Protein FE65, das eine WW Domäne enthält. Eine Bindung an diese Domäne wurde in früheren Experimenten schon in einem ‚pull down‘ mit der WW Domäne von FE65 gezeigt, bei dem (neben PREL1 (prp48)) Mena präzipitiert werden konnte (Ernekova et al., 1997). Allerdings hat PREL1 kein 100%-iges Motiv für die WW Domäne, was die schwache Kopräzipitation erklären kann und auf eine indirekte Interaktion über Mena hindeutet.



**Abbildung 3.13: Die prolinreichen Sequenzen in PREL1 präzipitieren EVH1 und SH3 Domänen enthaltende Proteine.** „Pull down“ Experimente mit den prolinreichen Abschnitten von PREL1 (PR-N = prolinreicher N-Terminus; PR-C = prolinreicher C-Terminus) in Fusion mit GST präzipitieren neben den Ena/VASP Proteinen VASP und Mena, auch Proteine mit SH3 Domänen wie Grb2, Nck und Abl. Eine schwächere Bindung an den N-Terminus von PREL1 zeigt auch FE65, das eine WW Domäne enthält. Es wurde das GFP-Konstrukt des Proteins verwendet, da keine spezifischen FE65 Antikörper für den Western Blot (WB) vorlagen. Die Molekulargewichte der Proteine sind in kDa angegeben.

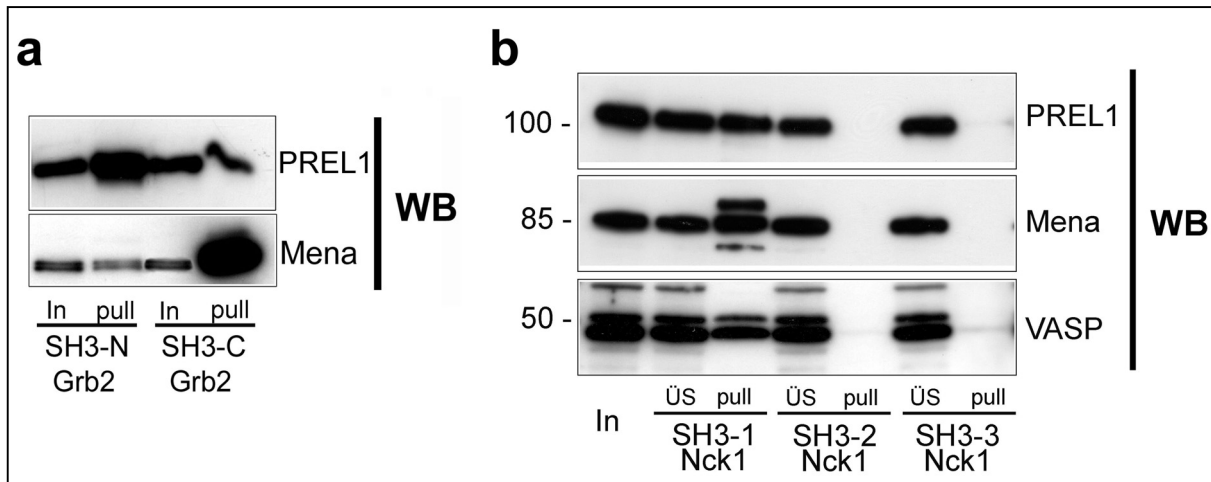
#### *PREL1 wird über die SH3 Domänen von Grb2 und Nck1 präzipitiert*

Die Adaptor Proteine Grb2 und Nck1 weisen in ihrer Sequenz zwei bzw. drei SH3 Domänen und je eine SH2 Domäne auf. Aufgrund der unterschiedlichen Spezifität der SH3 Domänen können diese einerseits an verschiedene Motive im selben Protein, andererseits an verschiedene Proteine binden (Zarrinpar et al., 2003).

In den „pull down“ Experimenten mit den prolinreichen Sequenzen von PREL1 konnten endogenes Grb2 und Nck1 über den prolinreichen C-Terminus präzipitiert werden. Daher sollte durch „pull downs“ mit den SH3 Domänen von Grb2 und Nck die Bindung von PREL1 an diese Proteine bzw. Domänen verifiziert werden. Zudem sollte untersucht werden, ob die SH3 Domänen dieser Proteine eine Spezifität zeigen oder ob jede SH3 Domäne PREL1 präzipitiert. Dafür wurden die N- und die C-terminale SH3 Domäne von Grb2 und die SH3 Domänen 1-3 von Nck1 als GST-Fusionsproteine hergestellt (zur Verfügung gestellt von Anke Fabian, GBF Braunschweig) und an Glutathion-Sepharose gebunden für „pull down“ Experimente verwendet.

Mit den SH3 Domänen von Grb2 konnte PREL1 aus Zelllysaten über beide, jedoch stärker über die N-terminale SH3 Domäne, präzipitiert werden (3.14, a, oben). Neben PREL1 konnte auch das Ena/VASP Familien Mitglied Mena im Präzipitat der C-terminalen SH3 Domäne von Grb2 nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.14, a, unten).

Die SH3-1 Domäne von Nck1 präzipitierte PREL1 aus Zelllysaten verschiedener Zelllinien, nicht aber die anderen beiden SH3 Domänen von Nck1. Neben PREL1 konnten auch Mena und VASP im Präzipitat der SH3-1 Domäne von Nck1 detektiert werden, nicht aber bei den anderen SH3 Domänen (siehe Abb. 3.14, b).



**Abbildung 3.14: PREL1 wird über die SH3 Domänen von Grb2 und Nck1 präzipitiert.**

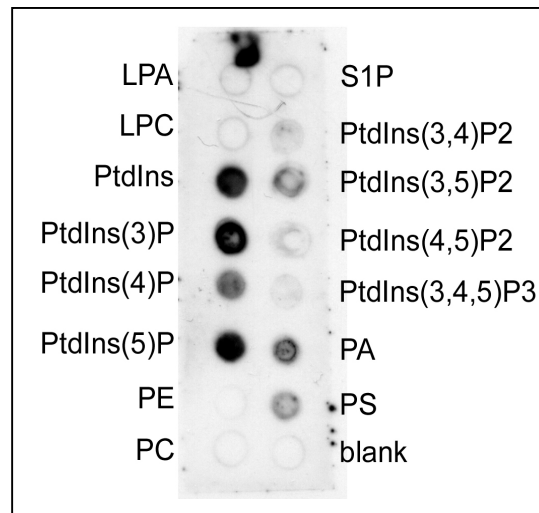
(a) ‚Pull down‘ Experimente mit den SH3 Domänen im N- und C-Terminus in Fusion mit GST von Grb2 präzipitieren PREL1 und Mena. (b) PREL1 und Mena/VASP Proteine (Mena und VASP) werden ausschliesslich mit der SH3-1 Domäne von Nck1 präzipitiert. Der Überstand (ÜS) dient als Nachweis für nicht-präzipitiertes Protein nach dem ‚pull down‘. In zeigt den Überstand vor dem ‚pull down‘. Die Molekulargewichte sind in kDa angegeben.

### 3.3.2 Die PH Domäne von PREL1 bindet Phosphatidylinositol-Monophosphate

Pleckstrin-Homologie-Domänen stellen Interaktionsoberflächen für Lipide dar, können aber in manchen Fällen auch Protein-Protein Interaktionen vermitteln (Lemmon, 2003). Sie kommen in einer Vielzahl von Proteinen vor und können verschiedene Aufgaben übernehmen. So haben sie die Fähigkeit Proteine an die Zellmembran zu rekrutieren oder über Inositol-Phosphat-Bindung Enzyme zu aktivieren.

Um eine mögliche Bindung der PH Domäne in PREL1 an Phospholipide zu untersuchen, wurde die PH Domäne als GST Fusionsprotein hergestellt und für einen Lipid-Overlay verwendet. Dafür wurde ein kommerziell erwerblicher sog. ‚PIP-Strip‘ (Echelon), auf dem verschiedene Lipide in einer definierten Konzentration aufbracht sind (50µg pro Spot) mit 0,01µg/ml der rekombinant hergestellten PH Domäne in Fusion mit GST inkubiert und nach Hersteller-Angaben entwickelt (siehe 2.6.5). Die Evaluation der Signalstärke mit einer CCD-Kamera zeigte, dass die PH Domäne von PREL1 spezifisch an Phosphatidylinositol-Monophosphate bindet (siehe Abb.3.15). Das stärkste Signal wurde bei den Lipiden PtdIns(5)P und PtdIns(3)P festgestellt. Diese Spezifität konnte von Shen et al. (2002) auch für

die PH Domäne von Grb7 gezeigt werden, was auch durch die grosse Sequenzhomologie in der GM-Region zwischen Grb7 und PREL1 unterstützt wird.



**Abbildung 3.15: Lipid-Overlay mit der PH Domäne von PREL1.** Inkubiert man einen ‚PIP-Strip‘ (Echelon), auf dem verschiedene Lipide aufgetragen sind, mit 0,01µg/ml der rekombinanten PH Domäne von PREL1 in Fusion mit GST, so ist eine spezifische Bindung der PH Domäne an Phosphatidylinositol-Monophosphate zu sehen. Die stärksten Signale ergaben sich nach Auswertung mittels CCD-Kamera und AIDA Image Analyzer Software für PtdIns(5)P und PtdIns(3)P.

### 3.3.3 Die RA Domäne von PREL1 bindet lipid-abhängig an die kleine GTPase Ras

RA (Ras-Assoziations) Domänen wurden in einer Vielzahl von Proteinen gefunden, wie z.B. RalGEF/AF6. Bei diesen Proteinen wurde eine spezifische Bindung an RasGTP über die RA Domäne nachgewiesen (Wojcik et al., 1999), bei Grb7/10/14-Proteinen konnte allerdings bisher keine Funktion der RA Domäne gefunden werden (Han et al., 2001).

In ‚pull down‘ Experimenten und Immunpräzipitationen sollte untersucht werden, ob die RA Domäne von PREL1 in der Lage ist an Mitglieder der Ras Familie der kleinen GTPasen zu binden. Dazu wurde die RA Domäne von PREL1 als GST-Fusionsprotein mit Lysaten von Zellen inkubiert, die die konstitutiv aktiven Mutanten verschiedener Ras GTPasen exprimierten und die mit verschiedenen Aufschlussmethoden hergestellt wurden. Die *in vitro* Daten zeigen, dass die RA Domäne in Fusion mit GST nur kleine Mengen H-RasV12 (und K-RasV12, nicht gezeigt) präzipitieren kann. Aus dieser schwachen Interaktion konnte aber noch keine klare Bindung geschlossen werden (Abb. 3.16, a).

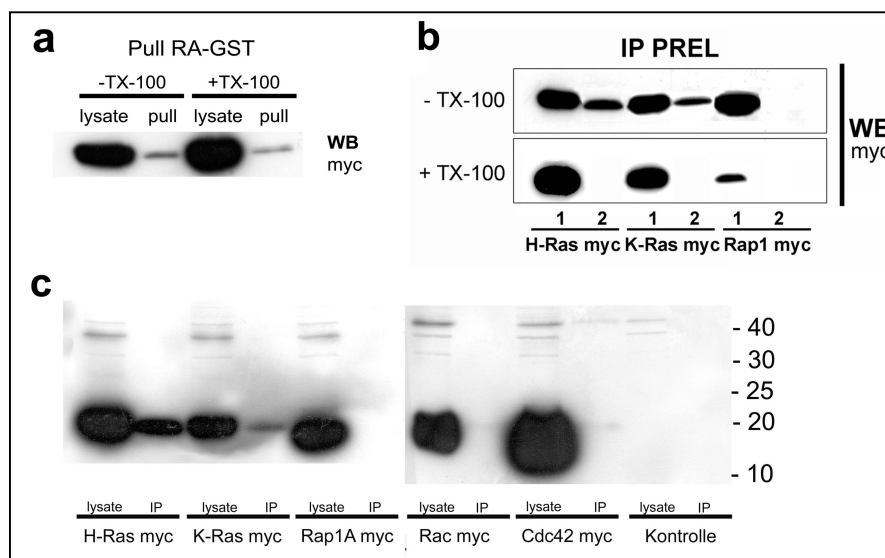
Zudem wurden Koimmunpräzipitationen von endogenem PREL1 mit ektopisch exprimierten myc-getagten konstitutiv aktiven Mutanten von Ras, Rap1A, Rac, Cdc42 und Rho durchgeführt. PREL1 volle Länge konnte signifikante Mengen an RasV12 kopräzipitieren (siehe Abb. 3.16, b, obere Reihe), allerdings nur in der kompletten Abwesenheit von



Detergenzien, während kleinste Mengen von TX-100 oder NP-40 ausreichen, die Interaktion zu stören (Abb. 3.16, b, untere Reihe).

Familienmitglieder der Rho-Familie, Rac, Cdc42 (Abb. 3.16, c) und Rho (nicht gezeigt) konnten nicht präzipitiert werden, und sogar die Ras-Familien GTPase Rap1A konnte in Immunpräzipitaten nicht detektiert werden.

Diese Daten deuten darauf hin, dass die Bindung von PREL1 an kleine GTPasen hochspezifisch ist, sogar innerhalb der Ras-Subfamilie. Weiterhin zeigen diese Ergebnisse, dass eine Bindung von PREL1 an Triton-lösliche Komponenten (wie z.B. Phospholipide) notwendig ist für eine effiziente Interaktion von PREL1 mit der aktivierten Ras-GTPase.



**Abbildung 3.16: PREL1 präzipitiert Ras *in vitro* und *in vivo*.** (a) Die RA Domäne von PREL1 in Fusion mit GST präzipitiert die kleine GTPase Ras, die als konstitutiv aktive Form mit myc-tag in NIH3T3 Zellen exprimiert wurde. (b) Immunpräzipitationen mit dem polyklonalen PREL1 Antikörper 1-420 zeigen eine Bindung von Gesamt-Protein PREL1 an H-Ras und K-Ras nur in der kompletten Abwesenheit von TX-100 (obere Reihe). Die mit 1 gekennzeichneten Reihen zeigen Lysate, die mit 2 die Immunpräzipitate. (c) IPs zeigen eine Spezifität von PREL1 für Ras, da GTPasen der Rho-Familie Rac und Cdc42 nicht präzipitiert werden. Auch Rap1A, ein Mitglied der Ras-Subfamilie, wird nicht von PREL1 kopräzipitiert. Alle GTPasen wurden als konstitutiv aktive myc-getagte Form vor der IP in NIH3T3 Zellen transfiziert. Als Kontrolle für eine spezifische Bindung dienten untransfizierte NIH3T3 Zellen. Das Molekulargewicht des Markers ist in kDa angegeben. Der Western Blot wurde mit dem myc-Antikörper 9E10 entwickelt, wobei die Kreuzreaktion auf 40kDa als Nachweis in der Kontrolle diente.

### 3.4 Die Aktivität von Ras korreliert mit der Lokalisation von PREL1

Eine Bindung von PREL1 an die kleine GTPase Ras liess die Vermutung zu, dass die Lokalisation oder die Rekrutierung von PREL1 möglicherweise durch zelluläres RasGTP reguliert wird. Um mehr über den Rekrutierungsmechanismus von PREL1 zu lernen, wurde die Lokalisation von PREL1 unter verschiedenen Bedingungen, bei gleichzeitiger Messung

der Ras-Aktivität, analysiert. Dabei wurden Ras Aktivierungs assays mit ‚spreading assays‘ kombiniert. Es war bekannt, dass NIH3T3 Zellen beim Ausbreiten („spreading“) auf Fibronektin (FN) eine starke transiente Ras-Aktivierung durchlaufen (Clark and Hynes, 1996). In Ras Aktivierungs assays werden Zellen auf Fibronektin beschichtete Zellkulturschalen replattiert und nach bestimmten Zeitpunkten lysiert. Es werden ‚pull downs‘ mit der Ras-GTP Bindedomäne von Raf1 durchgeführt (Upstate). In Western Blots mit einem Ras-Antikörper kann dann bestimmt werden, wie viel RasGTP an die Domäne gebunden hat, was den Anteil an RasGTP in den Zellen widerspiegelt. Die Auswertung erfolgt mittels CCD-Kamera und AIDA Image Analyzer Software.

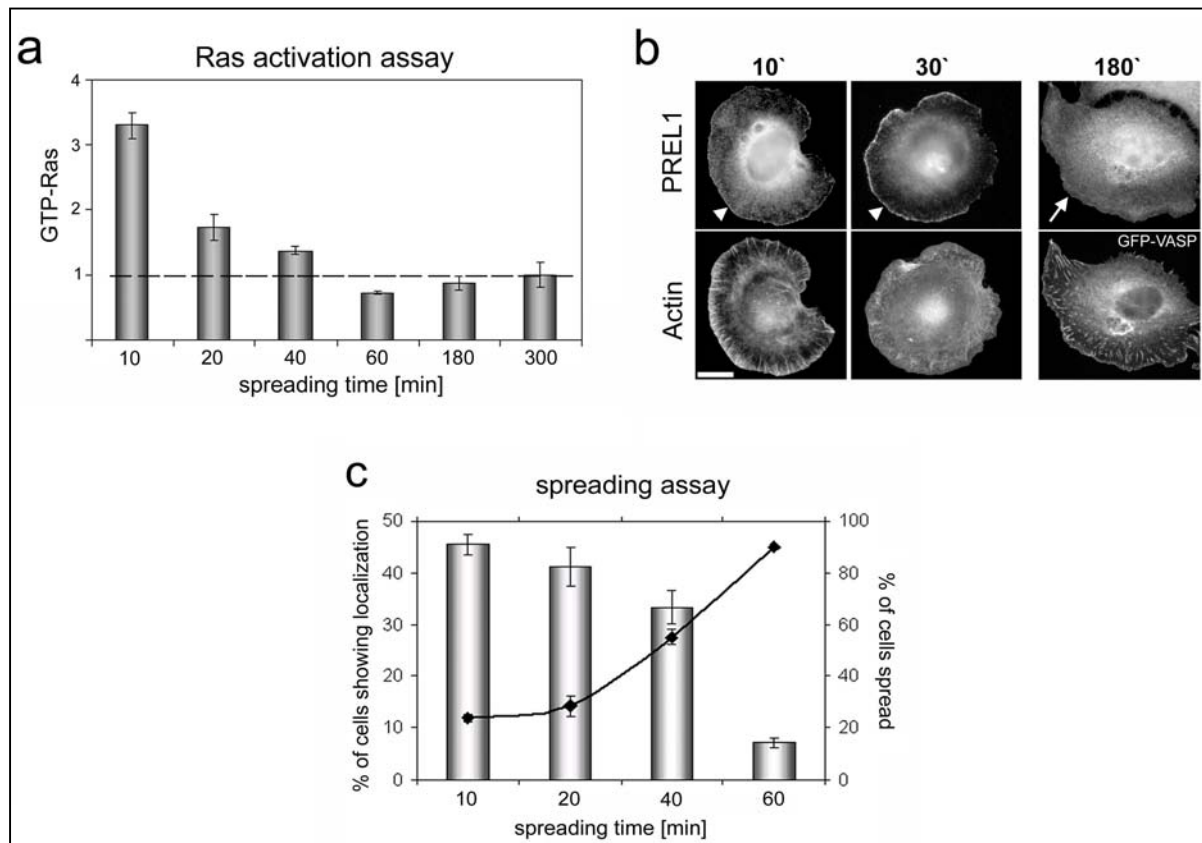
Der Ras Aktivierungs assay mit NIH3T3 Fibroblasten zeigte die höchste Ras-Aktivität in den ersten 10 min. nach Replattierung auf Fibronektin (FN). Schon nach 20 Minuten nimmt die Aktivität wieder deutlich ab und kehrt nach 40-60 Minuten auf einen basalen Zustand zurück (siehe Abb. 3.17, a). Korrespondierend zu den gewählten Zeitpunkten für den Ras Aktivierungs assay, wurden NIH3T3 Zellen auf mit FN beschichtete Glas coverslips replattiert, nach den entsprechenden Zeiten mit 4%PFA fixiert und mit dem polyklonalen PREL1 Antikörper 1-420 und Phalloidin, für die Anfärbung des Aktinzytoskeletts, gefärbt.

Während der hohen Ras-Aktivität in den ersten 40 min. nach Replattierung ist mit dem PREL1 Antikörper eine Färbung der lamellipodialen Spitze in den sich ausbreitenden Zellen zu sehen (siehe linkes und mittleres oberes Bild in 3.17, b). Nach 60 min., wenn der Anteil an zellulärem RasGTP wieder normal ist, kann kaum bis keine Lokalisation von PREL1 an der Spitze von Lamellipodien detektiert werden, während Ena/VASP Proteine weiterhin eine typische subzelluläre Verteilung zeigen (rechte obere und untere Abb. in 3.17, b).

Um herauszufinden, ob die Anzahl der Zellen, die eine Rekrutierung von PREL1 an der lamellipodialen Spitze zeigen, mit der zellulären Ras-Aktivität korreliert, wurden detaillierte Quantifizierungen durchgeführt.

Es wurden zum einen die Prozentzahl der Zellen bestimmt, die eine Lokalisation von PREL1 an der lamellipodialen Spitze aufwiesen (Säulendiagramm in Abb. 3.17, c), im Vergleich zu der Prozentzahl der Zellen, die sich zu den angegebenen Zeitpunkten ausbreiteten oder schon ausgebreitet waren (Liniendiagramm in Abb. 3.17, c).

Es ist eine deutliche Korrelation zwischen einer hohen Ras-Aktivität und der Lokalisation von PREL1 während des ‚spreadings‘ zu erkennen. Nach 60 min., wenn der Anteil an zellulärem RasGTP auf seinen basalen Zustand zurückgekehrt ist, sind kaum noch Zellen zu finden, die eine Lokalisation von PREL1 an der lamellipodialen Spitze aufweisen. Mit abnehmender Ras-Aktivität sinkt auch die Anzahl der Zellen, die eine PREL1 Lokalisation zeigen.



**Abbildung 3.17: Ras-Aktivierung korreliert mit der Lokalisation von PREL1 in NIH3T3 Fibroblasten.** (a) Die Aktivität von Ras in sich ausbreitenden NIH3T3 Zellen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten quantifiziert, nachdem die Zellen auf Fibronektin replattiert worden waren. Der Zeitpunkt, in der die Ras-Aktivität einen basalen Zustand zeigt (300 min), wurde auf 1 gesetzt. (b) Zusätzlich wurde die Lokalisation von PREL1 während der Ausbreitung der Zellen durch Immunfluoreszenzen mit dem pc Antikörper PREL1 1-420 bestimmt. PREL1 lokalisiert an der lamellipodialen Spitze in sich ausbreitenden Zellen (Pfeilspitze). Darunter sind die korrespondierenden Aktinfärbungen zu sehen. Nach Beenden des Ausbreitungsprozesses ist keine Lokalisation von PREL1 an der Spitze von Lamellipodien zu detektieren (Pfeil, rechts oben), obwohl VASP noch lokalisiert (rechts unten). Der Balken ist gültig für alle Bilder und entspricht einer Größe von 10  $\mu\text{m}$ . (c) Eine Quantifizierung der Anzahl der Zellen in Prozent, die sich zu den angegebenen Zeitpunkten ausgebreitet haben (Liniendiagramm), im Vergleich zu der Prozentzahl an sich ausbreitenden Zellen, die eine Lokalisation von PREL1 an der lamellipodialen Spitze zeigen (Säulendiagramm). Alle Zeitpunkte sind in Minuten (min) angegeben.

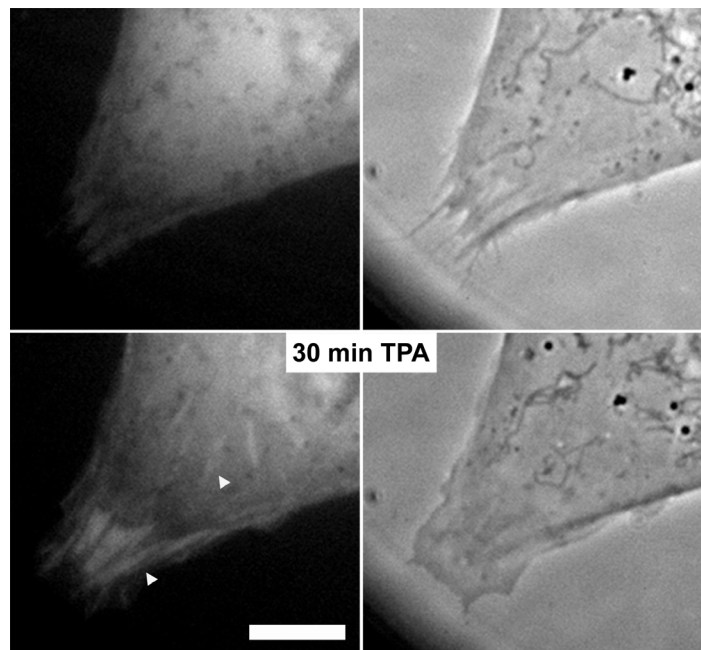
### 3.5 Eine Erhöhung der Ras-Aktivität führt zur Translokation von PREL1 in Adhäsionsstrukturen

Es konnte gezeigt werden, dass Phorbolester wie Tetradeconoylphorbol-13-Acetat (TPA) oder Phorbol 12,13-dibutyrate (PDBu) zu einer signifikanten Ras-Aktivierung führen (Downward et al., 1992; El-Shemerly et al., 1997). Dabei werden Effektoren von Ras direkt moduliert, wie z.B. die Protein-Kinase C (PKC), was zu einer Aktivierung des Ras-MEK-ERK Signalweges führt (Ueda et al., 1996).

### *Stimulierung mit TPA*

Im Ras Aktivierungs- und im ‚spreading assay‘ konnte eine Korrelation zwischen einer Lokalisation von PREL1 an der Spitze von Lamellipodien und einer Aktivierung von Ras in sich ausbreitenden NIH3T3 Zellen gezeigt werden.

Um weiter einen Zusammenhang zwischen der Aktivierung von Ras und der Translokation von PREL1 an Stellen aktiver Aktindynamik, wie Lamellipodien oder Fokalkontakten, zu bestätigen, wurde experimentell die Ras-Aktivität in Zellen durch Phorbol ester-Behandlung erhöht. Dazu wurden NIH3T3 Zellen mit GFP-PREL1 transfiziert und nach Beenden der Ausbreitung mit dem Phorbol ester TPA stimuliert. Die GFP-PREL1 exprimierenden Zellen zeigten anfangs hauptsächlich eine zytoplasmatische Verteilung des Fusionsproteins in der Zelle. Nach der Stimulierung mit TPA konnte eine deutliche Translokation von GFP-PREL1 in Fokalkontakte beobachtet werden (siehe Abb. 3.18).



**Abbildung 3.18: Lokalisation von GFP-PREL1 nach TPA-Stimulierung.**

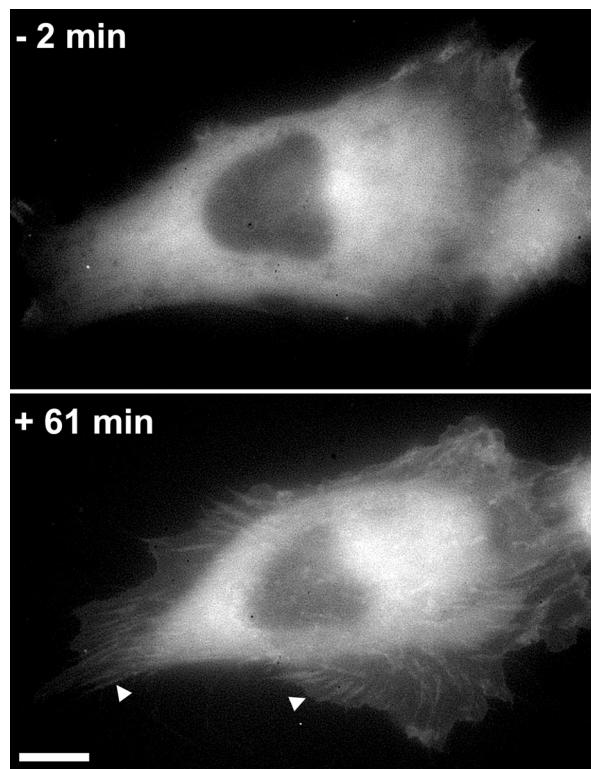
GFP-PREL1 exprimierende NIH3T3 Zellen vor (oben links) und nach 30 minütiger TPA Behandlung (unten links). GFP-PREL1 transloziert deutlich in Fokalkontakte (Pfeilspitzen, unten). Die Bilder auf der rechten Seite zeigen die korrespondierenden Phasenkontrastaufnahmen der selben Zelle und entstammen Sequenzen eines live-Videos, in welchem die behandelte Zelle über einen Zeitraum von 40 min. beobachtet wurde. Der Balken entspricht einer Größe von 10 µm.

### *Mikroinjektion von H-RasV12*

Mit der Mikroinjektion von konstitutiv aktiven GTPasen in Zellen kann der Effekt einer Stimulierung, wie man ihn mit Wachstumsfaktoren oder Phorbol estern auslöst, simuliert werden. Dazu wird die rekombinant hergestellte und konstitutiv aktive Mutante der GTPase über eine Mikroinjektionsnadel in einer bestimmten Konzentration (hier 2,5 mg/ml) in das

Zytoplasma einer vorher mit dem zu untersuchenden GFP-Konstrukt transfizierten Zelle injiziert. Der Effekt, den das Einbringen der GTPase erzeugt, kann man durch live-Video Mikroskopie beobachten. Da mit Phorbol ester-Behandlung eine Translokation von GFP-PREL1 in Fokalkontakte zu beobachten war, sollte überprüft werden, ob PREL1 nach Mikroinjektion von H-RasV12 eine vergleichbare Translokation zeigt.

Vor der Mikroinjektion der GTPase ist hauptsächlich eine zytoplasmatische Verteilung von GFP-PREL1 in ausgebreiteten NIH3T3 Fibroblasten zu sehen (Abb. 3.19, oben). Mikroinjiziert man H-RasV12 in GFP-PREL1 exprimierende Zellen, so zeigt sich, dass GFP-PREL1 in fokale Adhäsionsstrukturen rekrutiert wird. Eine deutliche Lokalisation von GFP-PREL1 in Fokalkontakten kann noch nach über einer Stunde beobachtet werden (siehe Abb. 3.19, Pfeilspitzen, unteres Bild).



**Abbildung 3.19: GFP-PREL1 lokalisiert in Fokalkontakten nach H-RasV12 Mikroinjektion.**

GFP-PREL1 exprimierende NIH3T3 Zellen zeigen im ausgebreiteten Zustand keine Lokalisation von PREL1 (oberes Bild). Mikroinjiziert man 2,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  H-RasV12 in diese Zelle, so zeigt sich eine Translokation von GFP-PREL1 in Fokalkontakte (Pfeilspitzen, unteres Bild). Diese Kontaktstrukturen sind an den äusseren Rändern und auch unter der Zelle zu sehen. Die Bilder entstammen Sequenzen eines live-Videos, in welchem die injizierte Zelle über einen Zeitraum von 70 min. beobachtet wurde. Das obere Bild ist 2 min. vor der Mikroinjektion aufgenommen worden, das untere 61 min. danach. Der Balken entspricht einer Größe von 10  $\mu\text{m}$ .

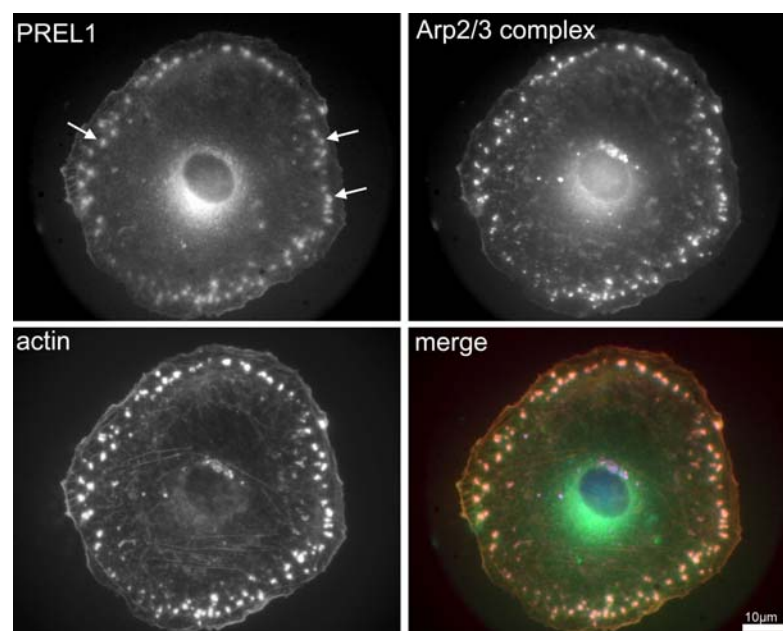
### *Behandlung mit PDBu*

Stimuliert man A7r5 Glattmuskel-Zellen für 30-60 min. mit dem Phorbol ester PDBu, so bilden diese Zellen Podosomen (Kaverina et al., 2003). Podosomen sind ringförmige Adhäsionsstrukturen, die verschiedene molekulare Komponenten mit ‚klassischen‘ Matrix-Kontakt Strukturen, wie Fokalkontakten, gemeinsam haben und hauptsächlich in Zellen monozytischen Ursprungs (Makrophagen, Leukozyten) vorkommen.

Podosomen enthalten zusätzlich Komponenten der Aktinpolymerisations-Maschinerie, wie den Arp2/3 Komplex und das Wiskott-Aldrich Syndrom Protein (WASP) und sind im Allgemeinen an Stellen schneller Polymerisation/Depolymerisation von Aktinfilamenten zu finden (Schafer et al., 1998).

Da PREL1 in Fokalkontakten vorkommt, sollte untersucht werden, ob es auch in Podosomen lokalisiert, da diese Strukturen ähnliche Protein-Komponenten beinhalten. Für Immunfluoreszenzen wurden A7r5 Glattmuskel-Zellen mit GFP-PREL1 transfiziert, auf Glas coverslips replattiert und für 30 bzw. 60 min. mit PDBu stimuliert. Anschliessend wurden die Zellen mit PFA fixiert und das Aktinzytoskelett mit Phalloidin gefärbt. Als Kontrollfärbung diente ein monoklonaler p16 ArpC5-Antikörper (323H3).

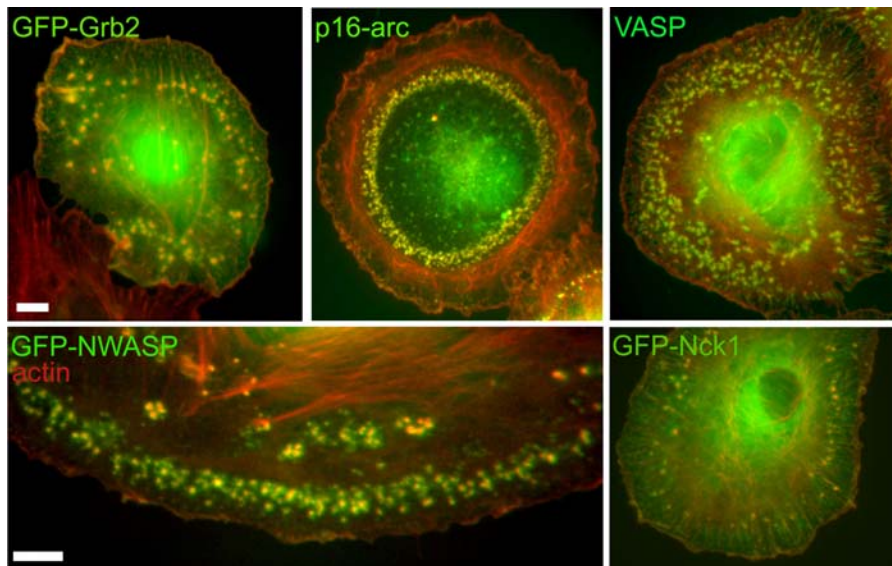
In Phorbol ester-stimulierten A7r5 Zellen konnte GFP-PREL1 in Podosomen detektiert werden, wo es mit dem Arp2/3 Komplex und Aktin kolokalisiert (siehe Abb. 3.20). Des weiteren ist es auch an der lamellipodialen Spitze zu finden.



**Abbildung 3.20: PREL1 lokalisiert in Podosomen in A7r5 Zellen.** Mit PDBu stimulierte A7r5 Glattmuskel-Zellen zeigen eine Lokalisation von GFP-PREL1 in Podosomen (Pfeile, oben links). Es kolokalisiert mit Aktin (unten links) und dem Arp2/3 Komplex (oben rechts). Überlagernde Strukturen erscheinen orange (merge). Der Balken entspricht einer Größe von 10 µm.

Proteine, die mit PREL1 im ‚pull down‘ präzipitierten, wurden teils als GFP-Konstrukte, teils mit spezifischen Antikörpern ebenfalls auf ihre Lokalisation in Podosomen untersucht. Aus anderen Studien war bereits die Anwesenheit des Arp2/3 Komplexes bekannt, ebenso wie die von N-WASP und einer Vielzahl anderer Proteine (Linder and Aepfelbacher, 2003).

So konnte ich in Podosomen –neben dem Arp2/3 Komplex – auch N-WASP, VASP, Nck1 und Grb2 detektieren (siehe Abb. 3.22). VASP, Nck1 und Grb2 lokalisierten neben den Podosomen ebenso in Fokalkontakten, wie auch Vinculin und Zyxin (nicht gezeigt).



**Abbildung 3.21: Molekulare Komponenten in Podosomen.** In Podosomen von A7r5 Zellen kolokalisieren nach PDBu Stimulierung Grb2, der Arp2/3 Komplex (hier dargestellt mit der Untereinheit p16 ArpC5), VASP, N-WASP und Nck1. Das Aktinzytoskelett ist in Rot angefärbt durch Alexa 594 konjugiertes Phalloidin. Überlagernde Bereiche erscheinen gelb. Die Balken entsprechen einer Größe von 10µm. Der Balken in der Grb2 Färbung ist gültig für alle Bilder, ausser für N-WASP.

Die Stimulierung mit Phorbolestern und H-RasV12, die zu einem Anstieg von zellulärem RasGTP in den Zellen führt, bewirkt eine Lokalisation von PREL1 in Adhäsionsstrukturen, wie Fokalkontakte und Podosomen. Dort kolokalisiert es mit Grb2, Nck1 und VASP, die auch in ‚pull down‘ Experimenten mit PREL1 präzipitiert werden konnten.

### 3.6 PREL1 lokalisiert in der Immunologischen Synapse

Die Immunologische Synapse (IS) ist eine spezialisierte Zell-Zell Verbindung zwischen T-Zellen und Antigenpräsentierenden Zellen (APC). Eine Immunantwort basiert auf der Interaktion zwischen dem T-Zell Rezeptor (TCR) und einem Komplex, der antigene Peptide gebunden hat (MHC). Die Formation der IS ist ein hoch aktiver Vorgang und abhängig von einem intakten Aktinzytoskelett.

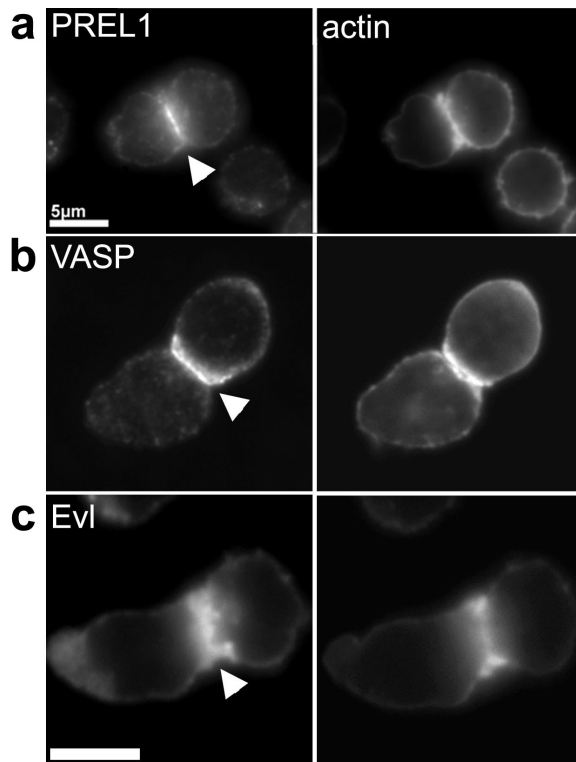
Im Western Blot und Northern Blot konnte eine Anreicherung von PREL1 im haematopoetischen System, vor allem auch im Thymus, gezeigt werden. Da Podosomen im haematopoetischen System sehr häufig vorkommen und strukturelle Ähnlichkeit mit der Immunologischen Synapse haben, stellte sich die Frage, ob PREL1 auch an der IS mit WASP/N-WASP kolokalisiert.

Um Interaktionen, die zur Ausbildung der IS führen zu erhalten, wurden CD4<sup>+</sup>-T-Zellen aus T-Zell Rezeptor transgenen Mäusen (DO11.10) isoliert. Ein Grossteil der T-Zellen aus dieser Maus trägt den transgenen T-Zell Rezeptor, der ausschließlich ein 12-Aminosäuren langes Peptid aus dem Protein Ovalbumin erkennt (OVA-Peptid). Als Antigenpräsentierende Zellen dienten B-Zellen aus Balb/c Mäusen. Die naiven B-Zellen wurden 24h vor der Interaktion mit OVA-Peptid beladen und mit den frisch isolierten T-Zellen inkubiert. Die präaktivierten B-Zellen wurden isoliert und nochmals mit OVA-Peptid beladen, bevor sie mit den T-Zellen im Verhältnis 1:1 gemischt wurden. Bei einem Aufeinandertreffen der Zelltypen kommt es zu einer Interaktion über den T-Zell Rezeptor, der spezifisch das OVA-Peptid auf der Oberfläche der beladenen B-Zellen erkennt. Es bilden sich T-Zell/B-Zell Paare, wobei an der Kontaktstelle zwischen den beiden Zelltypen die Immunologische Synapse entsteht (z.V.g. von B.Dornbach, GBF Braunschweig).

Die fixierten T-Zell/B-Zell Paare wurden in der Immunfluoreszenz mit dem polyklonalen PREL1 Antikörper 1-420 gefärbt und es konnte eine deutliche Anreicherung von PREL1 an der Kontaktstelle zwischen zwei interagierenden T- und B-Zellen beobachtet werden (siehe Abb.3.22, a).

Es war aus anderen Versuchen bekannt, dass Ena/VASP Proteine an der IS lokalisieren, ebenso wie andere Proteine, die für die Aktindynamik und Signalübertragung im haematopoetischen System verantwortlich sind. So konnten hier mit einem polyklonalen VASP Antikörper (5500-5; Abb. 3.22, b) und einem monoklonalen Evl Antikörper (84H1; Abb. 3.22, c) die Lokalisation von Ena/VASP Proteinen an der Immunologischen Synapse bestätigt werden.



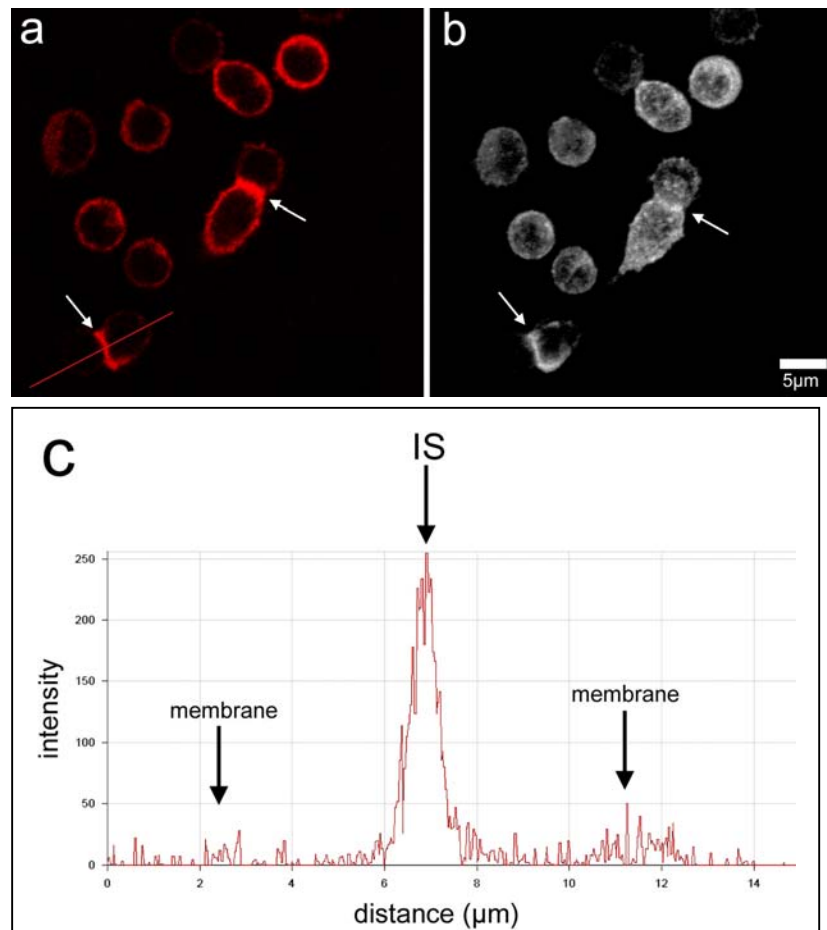


**Abbildung 3.22: PREL1 lokalisiert an der Immunologischen Synapse (IS).** Interagierende T- und B-Zellen bilden an der Kontaktstelle die IS aus. Dort kolokalisiert PREL1 (a) mit VASP (b) und Evl (c). Die Pfeilspitzen deuten auf die Lokalisation der Proteine an der IS. Eine Aktinfärbung ist in den rechten Bildern dargestellt. Auch hier ist eine Anreicherung an der IS zu erkennen. Die Balken entsprechen einer Größe von 5 µm.

Zusätzlich wurde die Lokalisation von PREL1 an einem konfokalen Mikroskop untersucht, um eine detailliertere dreidimensionale Ansicht der Anreicherung von PREL1 in der IS zu erhalten. In der Z-Ebene werden Schnitte durch die Zellen gemacht und die Einzelbilder werden dann zu einem dreidimensionalen Bild zusammengesetzt. Dadurch kann man die Zellen von allen Seiten betrachten.

Eine eindeutige Anreicherung von PREL1 an der IS ist zu erkennen (Abb. 3.23, Pfeile in b). Dreht man die Zellen um die X- oder Y-Achse, so ist PREL1 eher an den Rändern der IS, nicht so sehr im Zentrum lokalisiert. Dieser Eindruck kann aber auch mit dem Reifungsgrad der IS zusammenhängen. Die IS wird über einen Zeitraum von zwei Stunden akkumuliert und die beteiligten Proteine wandern in dieser Zeit in die Kontaktstelle von T- und B-Zellen ein (Dustin, 2002).

Ein Intensitäts-Scan (Abb. 3.23, a) durch die IS zeigt die Intensitäten der Färbung des PREL1-Antikörpers in den interagierenden Zellen. Hieraus ist eine deutliche Anreicherung von PREL1 zu erkennen, denn die Stärke der Färbung ist in dem Bereich der Interaktionsoberfläche zwischen den T- und B-Zellen, wo sich die IS befindet, am intensivsten (Abb. 3.23, c).



**Abbildung 3.23: Die dreidimensionale Darstellung der PREL1 Lokalisation in der IS verifiziert die Anreicherung von PREL1.** Die Lokalisation von PREL1 in der Immunologischen Synapse von interagierenden Zellen (Pfeile) ist auch im konfokalen Mikroskop zu erkennen (a). (b) zeigt die dreidimensionale Darstellung in der Y-Rotation. Ein Schnitt durch die IS (roter Strich in a), zeigt die Intensität der PREL1 Färbung an der Kontaktstelle der Zellen (c). PREL1 hat die höchste Anreicherung an der IS, eine schwächere Färbung ist in den äusseren Membranen der Zellen zu erkennen. Die Dicke der Z-Ebene betrug 9,9  $\mu\text{m}$  bei einer Vergrößerung von 200x. Der Balken gilt für (a) und (b) und entspricht einer Grösse von 5  $\mu\text{m}$ .

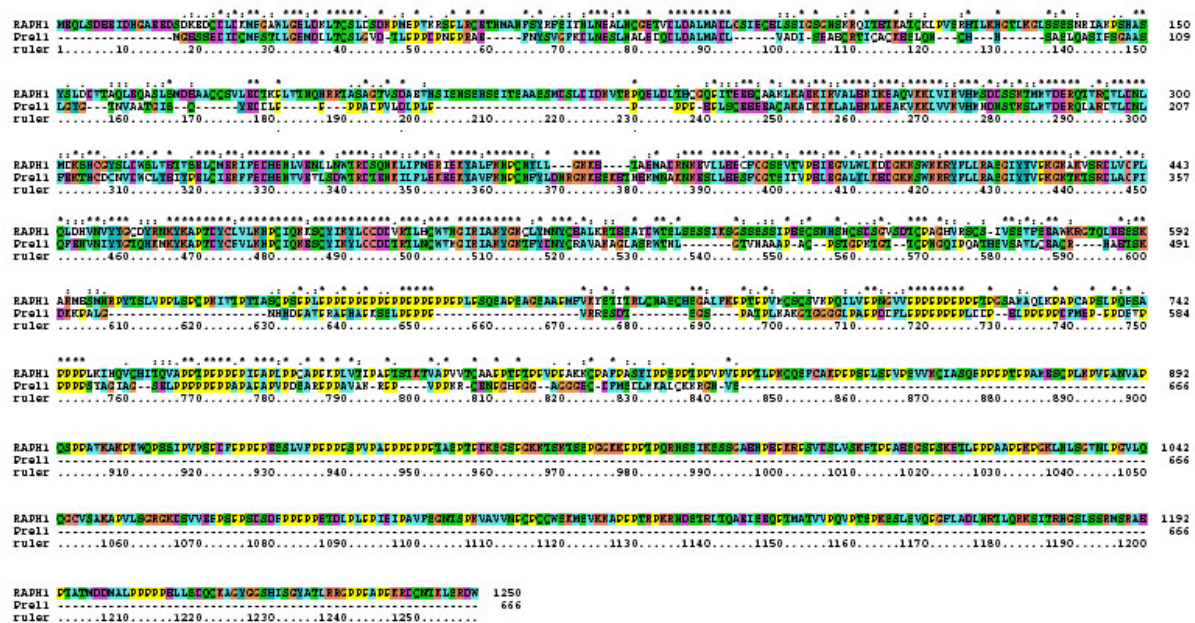
Die Anreicherung von PREL1 im haematopoetischen System und die Lokalisation an der Immunologischen Synapse deuten auf eine spezielle Funktion von PREL1 bei der Immunantwort. Die Kolokalisation mit Ena/VASP Proteinen konnte auch hier gezeigt werden.

### 3.7 PREL2 (KIAA1681)

PREL2 wurde anhand von Datenbankanalysen als zweites Gen der PREL-Subfamilie und Homolog zu PREL1 in Vertebraten gefunden. Es weist die gleiche Domänenstruktur auf wie PREL1, hat jedoch einen verlängerten C-Terminus mit einer hohen Anzahl von prolinreichen Abschnitten (Abb. 3.24). Die mRNA von PREL2, das in den Datenbanken als offenes

Leseraster (ORF) KIAA1681 oder RAPH1 (RA und PH) zu finden ist, hat eine Größe von 9604 bp. Die kodierende Sequenz von PREL2 umfasst 1250 AS und kodiert für ein Protein mit einem MW von ca. 134 kDa.

Zu PREL2 wurden orthologe Sequenzen in *Drosophila melanogaster* und *Anopheles gambiae* gefunden, nicht aber in *C.elegans* (siehe Kapitel 3.1). Das PREL2 Gen ist auf dem humanen Chromosom 10 in einer Region gefunden worden, die in der vererbaren neurodegenerativen Krankheit der Amylotropischen Lateralen Sklerose (ALS2) involviert ist. Dieses Gen wird als potentieller Kandidat für die Entwicklung dieser Krankheit gehandelt (ALSCR9, CR9=candidate region #9).



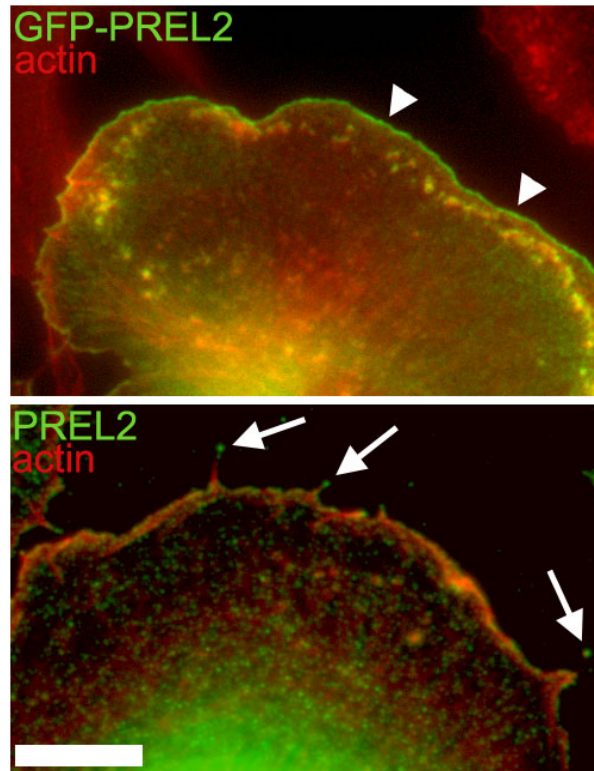
**Abbildung 3.24: Aminosäuresequenzvergleich zwischen PREL1 und PREL2.**

Die größten Unterschiede zwischen PREL1 und PREL2 (RAPH1) liegen im C-Terminus. PREL2 weist hier eine Verlängerung und eine größere Anzahl von prolinreichen Abschnitten auf (in gelb dargestellt). Die höchsten Homologien finden sich zwischen den Proteinen im N-Terminus und in der GM Region. Die Sterne deuten auf gleiche Aminosäuren.

Ein GFP-Konstrukt von PREL2 (z.V.g. von Dr. M. Innocenti, IEO Mailand) lokalisiert an der Spitze von Lamellipodien (Abb. 3.25, Pfeilspitze in a) und mit einem polyklonalen Antikörper gegen PREL2 (KIAA1681) konnte eine Lokalisation an der Spitze von Filopodien gezeigt werden (Abb. 3.25, Pfeil in b). PREL1 wurde bisher nicht an der filopodialen Spitze detektiert.

Western Blot Analysen und theoretische Northern Blots deuten auf eine Anreicherung von PREL2 im Gehirn hin. Über die Funktion der Domänen und weitere Bindungspartner von PREL2 ist bis heute nichts bekannt.

Für PREL1 konnte eine Bindung an Ena/VASP Proteine gezeigt werden. Aufgrund der hohen Homologie zu PREL1 ist auch eine Interaktion von PREL2 und Ena/VASP Proteinen wahrscheinlich. Beide Proteine lokalisieren an der Spitze von Lamellipodien, ihre unterschiedliche Anreicherung in den Organen lässt auf eine Aufgabenteilung zwischen den Proteinen schließen, vergleichbar mit den Proteinen der Ena/VASP Familie (siehe 4.1.2).



**Abbildung 3.24: PREL2 lokalisiert an der lamellipodialen Spitze und an der Spitze von Filopodien.** In B16F1 Zellen auf Laminin lokalisiert GFP-PREL2 an der Spitze von Lamellipodien (Pfeilspitzen, oberes Bild). SW3T3 Zellen auf Fibronectin, gefärbt mit einem polyklonalen anti PREL2 (KIAA1681) Antikörper, zeigen eine Lokalisation von PREL2 an der lamellipodialen Spitze und an der Spitze von Filopodien (Pfeile, unteres Bild). Das Aktinzytoskelett ist in rot dargestellt. Überlagernde Regionen erscheinen gelb. Der Balken entspricht einer Größe von 10  $\mu\text{m}$  und ist gültig für beide Bilder.

## 4 Diskussion

Die Proteine der Ena/VASP Familie spielen eine wichtige Rolle in der Regulation des Aktinzytoskeletts. Um die Funktion dieser Proteinfamilie besser zu verstehen, ist es wichtig neue Interaktionspartner zu identifizieren und zu analysieren. Einige Interaktionspartner der Ena/VASP Proteine in Fokalkontakten sind bereits gut charakterisiert, über Bindungspartner an der lamellipodialen Spitze war bis vor kurzem aber noch nichts bekannt.

Ziel dieser Arbeit war es, PREL1 (Proline Rich EVH1 Ligand 1), einen neuen Bindungspartner der Ena/VASP Proteine, im Detail zu untersuchen, da es als Ligand an der lamellipodialen Spitze und in Fokalkontakten mit Ena/VASP Proteinen kolokalisiert.

### 4.1 Die PREL-Proteinfamilie

#### 4.1.1 PREL1 gehört zu der Familie der Grb-Adaptor Proteine

Das in dieser Arbeit charakterisierte Protein PREL1 wurde bei einer Suche nach neuen Bindungspartner von Ena/VASP Proteinen identifiziert.

Eine Vielzahl von prolinreichen Abschnitten im N- und C-Terminus von PREL1 flankieren eine zentrale Ras-Assoziations (RA)- und eine Pleckstrin-Homologie (PH)-Domäne. Sequenzanalysen in Datenbanken zeigten, dass die Proteine der Grb7/10/14-Familie der Signal-Adaptoren eine ähnliche Domänenstruktur besitzen und eine hohe Homologie im Bereich der RA und PH Domänen zu PREL1 aufweisen. Dieser 300 AS lange Abschnitt wurde auch in dem *C.elegans* Protein MIG-10 gefunden und daher als GM-Region (Grb7/10/14-MIG Homologie-Region) bezeichnet (Daly, 1998; Manser et al., 1997). Zusätzlich haben die Mitglieder der Grb7/10/14-Proteinfamilie in ihrem C-Terminus eine Src Homologie 2 (SH2) Domäne, die eine Bindungsspezifität für Rezeptor-Tyrosinkinasen und andere Signalmoleküle aufweist (Han et al., 2001).

Da MIG-10 eine Rolle in der Regulation neuronaler Zellbewegung während der Embryonalentwicklung bei Nematoden spielt, lag die Vermutung nahe, dass Grb7/10/14-Proteine eine ähnliche Funktion in der Regulation der Zellbewegung in Säugern haben (Shen et al., 2002). Han et al. (2000) zeigten, dass Grb7 mit der ‚Focal Adhesion Kinase‘ (FAK) interagieren kann, indem es über seine SH2 Domäne einen

Phosphotyrosinrest in FAK bindet. Diese Assoziation mit FAK führt zu seiner Rekrutierung in Fokalkontakte und seiner Phosphorylierung durch FAK. Die Interaktion zwischen Grb7 und FAK ist für die Vermittlung von FAK-regulierter Zellbewegung kritisch (Han et al., 2000). Da die zusätzliche SH2 Domäne in den Grb7/10/14-Proteinen für die Interaktion der Proteine mit Zelloberflächen-Rezeptoren und anderen Phosphotyrosin-Signalen verantwortlich ist, sind die Proteine der Grb-Familie vermutlich in andere Signalwege involviert als PREL1 oder MIG-10, denen diese Domäne fehlt.

Die hohe Sequenzhomologie zwischen PREL1 und MIG-10 lässt darauf schließen, dass PREL1 eine vergleichbare Funktion zur Regulation der Zellbewegung in Säugerzellen hat wie das Protein MIG-10 im Nematoden.

#### **4.1.2 PREL1 und PREL2 bilden eine neue Genfamilie**

In Säugern wurde in Datenbankanalysen und Sequenzvergleichen ein homologes Protein zu PREL1 gefunden. Dabei handelt es sich um den offenen Leserahmen (ORF) KIAA1681 oder RAPH1 (RA und PH) mit einer Länge von 1250 AS und einem theoretischen MW von 134 kDa. Dieses Protein zeigt zu PREL1 die höchsten Homologien im N-Terminus und in der RA und PH Domäne (GM-Region). Der C-Terminus ist in KIAA1681, welches hier PREL2 genannt wurde, verlängert und weist eine höhere Anzahl an prolinreichen Abschnitten auf. Aminosäuresequenz-Untersuchungen ergaben, dass PREL2 in seinem C-Terminus ebenfalls potentielle EVH1 Bindungsstellen hat.

Homologie-Recherchen haben ergeben, dass in *C.elegans* neben MIG-10, dem Ortholog von PREL1, kein Ortholog zu PREL2 zu finden ist. In *Drosophila melanogaster* und *Anopheles gambiae* hingegen wurden PREL2-homologe, jedoch kein PREL1 homologes Gen detektiert. Dies deutet darauf hin, dass PREL1 und PREL2 Mitglieder einer neuen Genfamilie sind, die mit je einem Mitglied in *C.elegans* oder *D. melanogaster* und je zwei Mitgliedern in Vertebraten vertreten sind.

Mitglieder einer Genfamilie teilen sich oft die Aufgaben in den Zellen oder werden gewebespezifisch exprimiert. Bei den Ena/VASP Proteinen ist z.B. Mena im Gehirn und Nervensystem angereichert und wird als Protein mit drei verschiedenen Isoformen und Molekulargewichten exprimiert. Dabei werden in der mRNA von

Mena drei alternativ eingefügte Exons ‚gespliced‘, was zu drei Proteinen mit unterschiedlichem Molekulargewichten führt (Gertler et al., 1996). Im Fall von Evl wurde gezeigt, dass es vor allem im haematopoetischen System exprimiert wird (Lambrechts et al., 2000), VASP ist fast ubiquitär verteilt (Lanier et al., 1999). Trotz der unterschiedlichen Expressionsmuster zeigen alle Familienmitglieder der Ena/VASP Familie die gleiche Lokalisation an Stellen von Zell-Matrix-Kontakten (Fokalkontakte) und hoher Aktindynamik (lamellipodiale Spitze).

So könnte im Falle der PREL-Proteine eine ähnliche Aufgabenteilung wie bei den Ena/VASP Proteinen vorliegen. PREL1 ist im haematopoetischen System hochexprimiert, PREL2 dagegen im Gehirn. Beide Proteine lokalisieren an der lamellipodalen Spitze und können mit Ena/VASP Proteinen interagieren. Ein Hinweis auf isoformspezifische Funktionen ist die Lokalisation von PREL1 in Fokalkontakten, die von PREL2 an den Spitzen von Filopodien. Dort lokalisieren ebenfalls Ena/VASP Proteine mit denen sie interagieren können. Über die Funktion von PREL2 ist zu diesem Zeitpunkt nichts bekannt. Die Domänen könnten durchaus die gleichen Bindungspartner wie PREL1 aufweisen, da in diesem Bereich eine hohe Homologie auf Aminosäureebene gegeben ist.

## **4.2 PREL1 bindet an die EVH1 Domäne der Ena/VASP Proteine**

Die Identifizierung von PREL1 mit einem Antikörper, der das Konsensusmotiv der EVH1 Domäne der Ena/VASP Proteine erkennt, führte zu der Annahme, dass PREL1 mit Ena/VASP Proteinen interagieren kann. Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit GFP-Konstrukten von PREL1 und mit spezifischen polyklonalen Antikörpern gezeigt werden, dass PREL1 mit Ena/VASP Proteinen an der Spitze von Lamellipodien und in Fokalkontakten kolokalisiert (siehe auch Abb. 3.5 und 3.8). In *in vivo* und *in vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, dass PREL1 direkt mit Ena/VASP Proteinen interagiert. Ebenso wurde das Motiv, welches die EVH1 Domäne in PREL1 am stärksten erkennt, identifiziert. Dieses Motiv liegt im C-Terminus von PREL1 und entspricht damit fast der vorhergesagten Konsensussequenz D/E-FPPPP-XD/E für die EVH1 Domäne (siehe Abb. 3.12).

Die EVH1 Domäne der Ena/VASP Proteine ist ein 115 AS umfassendes Protein-Proteininteraktionsmodul, das ein essentieller Linker für seine Bindungspartner zu

verschiedenen Signaltransduktionswegen ist. EVH1 Domänen-enthaltende Proteine sind eng assoziiert mit aktinhaltigen Strukturen (Ball et al., 2002). Bekannte Bindungspartner sind Zyxin (Reinhard et al., 1995) und Vinculin (Reinhard et al., 1996), die mit Ena/VASP Proteinen aber nur in Fokalkontakten und an Stressfasern, nicht aber an der lamellipodialen Spitze interagieren (Rottner et al., 2001) oder das Oberflächenprotein ActA des intrazellulären bakteriellen Pathogens *Listeria monocytogenes* (Chakraborty et al., 1995). Vinculin, Zyxin und ActA binden über ein FPPPP-Konsensusmotiv an die EVH1 Domäne der Ena/VASP Proteine.

Über die Funktion der Ena/VASP Proteine gibt es unterschiedliche Hypothesen. So besagen einige Studien, dass Ena/VASP Proteine Aktinpolymerisation und Zellprotrusion an der lamellipodialen Spitze fördern (Garcia Arguinzonis et al., 2002). Andere Arbeiten ergaben, dass eine Überexpression von VASP zu einer verminderten Zellbewegung führt, während die Depletion von VASP und Mena die Zellmotilität fördert (Bear et al., 2000). Zudem könnte es möglich sein, dass Ena/VASP Proteine an der lamellipodialen Spitze und in Fokalen Adhäsionsstrukturen verschiedene Funktionen haben (Bear et al., 2000; Rottner et al., 1999).

Da bis vor kurzem kein Interaktionspartner der Ena/VASP Proteine an der Spitze von Lamellipodien bekannt war, ist PREL1 als Interaktionspartner der Ena/VASP Proteine an der lamellipodialen Spitze von grosser Bedeutung, um das Verständnis über Ena/VASP Proteine zu vertiefen. Die Bindung an PREL1 könnte neue Hinweise auf die Regulation und mögliche Mechanismen der Ena/VASP Proteine in der Aktindynamik geben.

Eine Rekrutierung von Ena/VASP Proteinen in Fokalkontakte erfolgt über die Bindungspartner Vinculin und Zyxin (Rottner et al., 2001). Da diese Proteine aber an der Spitze von Lamellipodien fehlen, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht, ob PREL1 als Ligand eine Rekrutierung von Ena/VASP Proteinen an die lamellipodiale Spitze verantwortet. Es konnte jedoch in dieser Arbeit gezeigt werden, dass PREL1 nicht für die Rekrutierung von Ena/VASP Proteinen an die lamellipodiale Spitze verantwortlich ist, da im ‚spreading assay‘ PREL1 bei niedriger Ras-Aktivität nicht mehr an der lamellipodialen Spitze lokalisiert, VASP aber weiterhin die typische subzelluläre Verteilung zeigte. Daraus kann man schliessen, dass PREL1 für die konstitutive Rekrutierung der Ena/VASP Proteine an Lamellipodien oder Fokalkontakte nicht essentiell ist, sondern dass PREL1 während der Aktivierung von Ras an Stellen schneller Aktinpolymerisation rekrutiert wird, wo



es wahrscheinlich dann durch Interaktionen, wie mit Ena/VASP Proteinen, die Aktindynamik moduliert.

### 4.3 PREL1 bindet lipidabhängig an Ras

Die zentrale Region in PREL1 umfasst eine RA und eine PH Domäne, die in der GM-Homologie Region liegen (siehe Abb. 3.2). PH Domänen kommen in einer Vielzahl von Proteinen vor und haben die Eigenschaft Inositol-Phosphate zu binden und dadurch an Membranen rekrutiert zu werden (Lemmon, 2003). Viele Proteine mit PH Domänen sind in intrazelluläre Signalwege involviert, die in der Organisation des Aktinzytoskeletts eine Rolle spielen (Bottomley et al., 1998).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PREL1 über seine PH Domäne an Phosphatidylinositol-Monophosphate bindet. Die höchste Bindungsaffinität war hier zu den Phosphatidylinositol-Monophosphaten PtdIns(5)P und PtdIns(3)P zu sehen (siehe Abb. 3.15). Die selbe Spezifität für diese Phospholipide konnte auch für Grb7 gezeigt werden (Shen et al., 2002), welches eine hohe Homologie in dieser Region mit PREL1 aufweist.

Untersuchungen der Bindungscharakteristik der RA Domäne in PREL1 mittels ‚pull down‘ Experimenten und Koimmunpräzipitationen ergaben, dass die RA Domäne von PREL1 spezifisch die kleine GTPase Ras bindet, nicht aber die ebenfalls zur Ras Unterfamilie gehörende GTPase Rap1A oder Mitglieder der Rho-Familie. Eine Bindung der RA Domäne war allerdings nur in der Abwesenheit von Detergenzien zu sehen, was darauf deutet, dass die Interaktion von PREL1 mit aktiviertem Ras nur dann stattfinden kann, wenn PREL1 an Triton-lösliche Komponenten, wie es die meisten Phospholipide sind, gebunden hat.

Daraus kann man schliessen, dass PREL1 spezifisch an RasV12 bindet und dass die Membraninteraktion der PH Domäne von PREL1 mit der RA Domänen-Assoziation an RasGTP während der Signalübertragung kooperiert. Resultate aus anderen Studien haben keine Bindung der isolierten RA Domäne der Grb7/10/14-Familie an Ras GTPasen gefunden. Eine Erklärung dafür könnte die Abhängigkeit der Bindung der RA Domäne an RasGTP von der intakten PH Domäne und deren Bindung an Phosphoinositide sein. Nicht nur die hohen Sequenzhomologien in der RA-PH Region der PREL-Proteine und der Grb7/10/14-Familie, sondern auch die

Bindungscharakteristik der PH Domäne an Phosphatidylinositole beider Subfamilien deuten auf ähnliche Bindungseigenschaften hin. Daher wäre es im Hinblick auf diese Ergebnisse interessant, die Bindung der Grb7/10/14-Proteine an Ras GTPasen erneut zu untersuchen.

#### **4.4 Die Lokalisation von PREL1 korreliert mit der Aktivität von Ras**

Die Bindung von PREL1 an RasGTP warf die Frage auf, ob die Lokalisation von PREL1 oder seine Rekrutierung an Stellen schneller Aktinpolymerisation durch zelluläres RasGTP reguliert ist. Es konnte früher gezeigt werden, dass eine Aktivierung von Integrinen zu einer Aktivierung von Ras und somit zu einer erhöhten ERK Aktivität führt. RasGTP wiederum reguliert die extrazelluläre Bindungsaktivität von Integrinen in erster Linie durch ihre Effekte auf das Aktinzytoskelett (Bar-Sagi and Hall, 2000) und spielt eine Rolle in der Wundheilung (Nobes and Hall, 1999). Eine Inhibierung von Ras führt zu einer reduzierten Zellbewegung. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Replattierung von Fibroblasten auf Fibronectin zu einer Aktivierung des Ras Signalweges führt. Diese Aktivierung erreicht ein Maximum in den ersten 10 Minuten und kehrt auf einen basalen Zustand innerhalb von 60 Minuten zurück (Clark and Hynes, 1996).

Die Ergebnisse dieser Arbeit machen deutlich, dass eine erhöhte Ras-Aktivität mit der Lokalisation von PREL1 an der Spitze von Lamellipodien in sich ausbreitenden NIH3T3 Zellen korreliert (Abb. 3.17). Die erhöhte Ras-Aktivität innerhalb der ersten 40 Minuten nach Replattierung auf Fibronectin konnte hier in einem Ras Aktivierungs assay bestätigt werden. In parallelen Immunfluoreszenzanalysen sich ausbreitender Zellen wurde zudem deutlich, dass PREL1 nur zu den Zeitpunkten einer hohen Ras-Aktivität an der Spitze von Lamellipodien lokalisiert. Kehrt der Anteil an RasGTP in der Zelle auf einen basalen Zustand zurück, ist keine Lokalisation von PREL1 an der lamellipodialen Spitze zu beobachten. Der Zusammenhang zwischen der Ras-Aktivität und der Lokalisation von PREL1 an der lamellipodialen Spitze wurde hier sehr deutlich. Eine Aktivierung von Ras durch die Aktivierung von Integrinen, wie sie bei der Replattierung von Zellen auf Fibronectin auftritt, führt also zu einer Rekrutierung von PREL1 an die Spitze von Lamellipodien in NIH3T3

Zellen. Zusammengefasst unterstützt sowohl die Ras-Abhängigkeit der PREL1-Rekrutierung als auch die Interaktion mit Ena/VASP Proteinen die Annahme, dass PREL1 in der Regulation der Zellmotilität eine wichtige Rolle spielt.

#### **4.5 Die Aktivierung von Ras führt zu einer Rekrutierung von PREL1 an das Aktinzytoskelett**

Die Behandlung mit Phorbolestern (Downward et al., 1992; El-Shemerly et al., 1997) oder die Mikroinjektion von RasV12 simuliert eine Aktivierung des Ras Signalweges, wie sie bei der Ausbreitung von NIH3T3 Zellen nach Replattierung auf Fibronectin auftritt. Um weiter den Zusammenhang zwischen der Aktivierung von Ras und der Translokation von PREL1 an das Aktinzytoskelett zu untersuchen, wurde die Ras-Aktivität in Zellen durch Mikroinjektion von konstitutiv aktivem Ras oder durch Phorbolster-Stimulierung experimentell erhöht.

Eine Behandlung von NIH3T3 Zellen mit dem Phorbolster TPA führte zu einer signifikanten Translokation von PREL1 in Fokalkontakte. Ähnliche Resultate wurden durch die Mikroinjektion von RasV12 in GFP-PREL1 exprimierenden Zellen erhalten (siehe Abb. 3.18 und 3.19). Eine Ras-Aktivierung führt demnach unter allen getesteten Bedingungen zu einer Rekrutierung von PREL1 an Stellen zellulärer Aktinreorganisation.

Die Annahme, dass PREL1 eine Rolle in Ras-abhängigen Signalwegen zur Zellmigration spielt, wird nicht nur durch seine Ras-abhängige Rekrutierung an das Aktinzytoskelett gestützt, sondern auch durch die Identifizierung weiterer PREL1 Bindungspartner deutlich, die alle eine Rolle in der Zellbewegung und im Ras Signalweg spielen.

So konnte in ‚pull down‘ Experimenten mit dem prolinreichen N- und C-Terminus von PREL1 neben Ena/VASP Proteinen auch Proteine mit SH3 Domänen präzipitiert werden. Dabei wurden die Proteine Grb2, Nck1 und Abl identifiziert (Abb. 3.13), die eine oder mehrere SH3 Domänen besitzen.

## 4.6 PREL1 interagiert mit Proteinen, die SH3 Domänen enthalten

SH3 Domänen kommen häufig in eukaryotischen Proteinen mit Funktionen in der Signaltransduktion und Proteinen des Zytoskeletts vor und spielen eine Rolle in Protein-Protein Interaktionen oder Zellkompartimentalisierung (Kay et al., 2000).

Grb2 und Nck gehören zu der Familie der SH2/SH3 Adaptor Proteine, die nur SH2 und SH3 Domänen aufweisen und keine enzymatischen Domänen beinhalten. Dazu gehören neben Grb2 und Nck auch Grb7/10/14. Abl hat zusätzlich zu seiner SH2 und SH3 Domäne eine SH1 oder ‚Src Family Tyrosine Kinase‘ Domäne. Alle diese genannten Proteine wurden schon in fokalen Adhäsionen lokalisiert (Goicoechea et al., 2002; Renshaw et al., 2000; Schlaepfer et al., 1997) oder mit deren Regulation in Verbindung gebracht (Shen and Guan, 2001; Woodring et al., 2003). Die Lokalisation von endogenem PREL1 konnte in SW3T3 Zellen auf FN und von GFP-PREL1 in B16F1 Zellen auf LN ebenfalls in Fokalkontakten beobachtet werden.

Grb2 (Growth factor receptor bound protein-2) besteht aus einer SH2 Domäne, die von zwei SH3 Domänen flankiert wird. Es ist ein Linker zwischen Membran-Proteinen und dem Ras-MAP Kinase-Signalweg durch die Interaktion mit Sos (Son of sevenless), ein Guanin Nukleotid-Austauschfaktor für Ras (De Vet et al., 2003).

Als Antwort auf die Stimulierung des EGF Rezeptors, bindet der Grb2/Sos Komplex an den auto-phosphorylierten EGF Rezeptor (Egan et al., 1993). Der Mechanismus der Ras-Aktivierung durch die Formation eines tertiären Komplexes aus EGFR/Sos/Grb2 ist das am besten charakterisierte Modell für die Funktion eines SH2/SH3 Adaptor Proteins. Grb2 lokalisiert in Fokalkontakten (Schlaepfer et al., 1997) und spielt eine Rolle in Rezeptor vermittelter Endozytose (Jiang et al., 2003). Ausserdem findet man es in Aktinschweiften motiler, induzierter Vesikel (Benesch et al., 2002) und von Pathogenen, wie z.B. Vaccinia Virus (Frischknecht et al., 1999).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Bindung über die N-terminale SH3 Domäne von Grb2 an die C-terminalen prolinreichen Regionen von PREL1 präsentiert werden. Ausserdem war es möglich, erstmals eine Interaktion zwischen Mena und der C-terminalen SH3 Domäne von Grb2 zu zeigen. Dies erklärt die schwache Kopräzipitation von PREL1 mit der SH3-C in Grb2, die vermutlich indirekt über Mena vermittelt wird.

Zusammengefasst deuten die Funktionen von Grb2 in Ras Signalwegen, seine Interaktion mit dem neuen Ras-Effektor PREL1 sowie die Interaktion beider Proteine, Grb2 und PREL1, mit Ena/VASP Proteinen darauf hin, dass diese Proteine in einem Komplex vorliegen, der eine wichtige Rolle in der Regulation der Aktindynamik spielt.

Ein weiteres SH2/SH3 Adaptor Protein –Nck1- konnte in ‚pull down‘ Experimenten mit dem prolinreichen C-Terminus von PREL1 präzipitiert werden. Das *vice versa* Experiment mit den SH3 Domänen von Nck1 zeigte eine spezifische Bindung an die erste SH3 Domäne. Die Mitglieder der Ena/VASP Proteinfamilie Mena und VASP konnten über die gleiche SH3 Domäne von Nck1 präzipitiert werden wie PREL1. Da eine SH3 Domäne nicht gleichzeitig mit mehreren Bindungspartnern interagieren kann, ist es wahrscheinlich, dass die Interaktion von PREL1 und Ena/VASP Proteinen zu Nck1 nicht gleichzeitig oder indirekt stattfindet. Auch die schwache Kopräzipitation von Nck1 über den prolinreichen C-Terminus von PREL1 deutet auf eine indirekte Interaktion zwischen den beiden Proteinen hin.

Nck1 (und Nck2) ist neben Fokalkontakten und der Zellperipherie sich ausbreitender Zellen auf Fibronectin (Goicoechea et al., 2002) auch in Aktinschweiften von Pathogenen wie Vaccinia Virus zu finden (Scaplehorn et al., 2002). Die Proteine der Nck Familie sind involviert in der Organisation des Aktinzytoskeletts, in der Zellbewegung oder der Axonausbildung (Buday et al., 2002). Die Lokalisation von Nck1 und die Funktionen, die dieses Protein in der Zellmigration übernimmt, lassen auf einen Komplex aus Nck, Ena/VASP Proteinen, PREL1 und Grb2 schliessen.

Die Abelson Tyrosin Kinase (Abl) wurde ebenfalls in ‚pull down‘ Experimenten mit dem prolinreichen N-Terminus von PREL1 präzipitiert. Zytoplasmatisches c-Abl wird durch Wachstumsfaktoren und Zelladhäsion aktiviert und lokalisiert in dynamischen Regionen des Aktinzytoskeletts wie Membran ‚ruffles‘ und Fokalkontakten, wie sie in aktiven sich ausbreitenden Fibroblasten gefunden werden oder in neuronalen Extensionen und Synapsen (Woodring et al., 2003). Weiterhin wurde gezeigt, dass eine hohe c-Abl Aktivität, wie sie in den ersten 30 min. nach Fibronectin-Stimulierung auftritt, zu einer Relokalisation von c-Abl in Fokalkontakte führt, wo eine Assoziation mit Paxillin und Grb2 stattfindet (Renshaw et al., 2000).

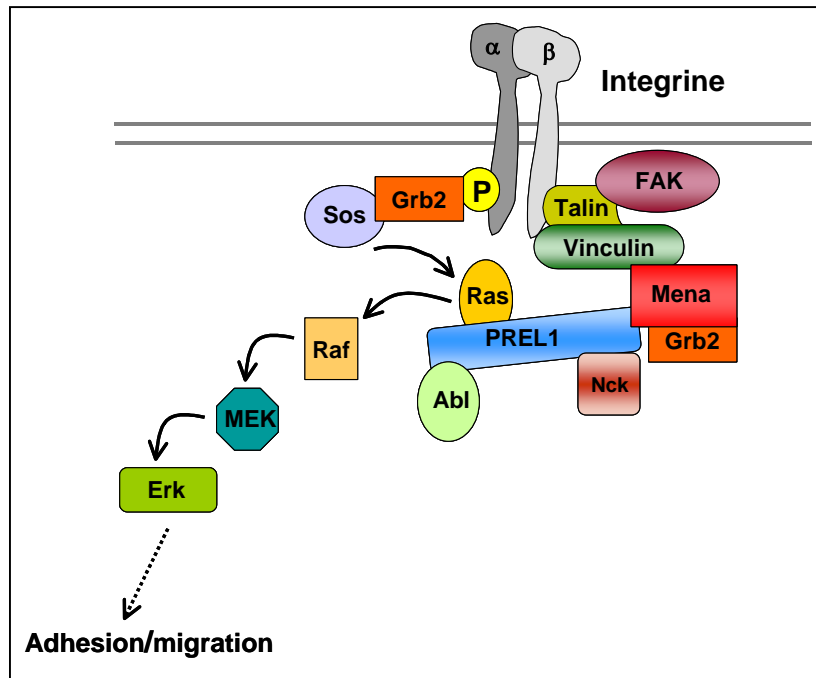
Da Ena/VASP Proteine an die SH3 Domäne von c-Abl binden können (Lambrechts et al., 2000) und VASP mit c-Abl in einem Adhäsions-abhängigen Komplex koimmunopräzipitiert (Howe et al., 2002), könnte der gesamte putative VASP/Grb2/PREL1-Proteinkomplex mit c-Abl an F-Aktinstrukturen rekrutiert werden. Aufgrund der Eigenschaften von Abl, der Lokalisation und der Involvierung in Ras-abhängige Prozesse ist es wahrscheinlich, dass der PREL1-Komplex Abl enthält und das Abl eine Rolle in der Rekrutierung von PREL1 in dynamische Aktinstrukturen spielt.

Zusätzlich zu den Proteinen der Ena/VASP Familie und den SH3 Domänen enthaltenen Proteinen Grb2, Nck1 und Abl konnte auch das WW Domänen-Protein FE65 über den prolinreichen N-Terminus von PREL1 präzipitiert werden. Diese Interaktion konnte schon in anderen ‚pull down‘ Experimenten mit der WW Domäne von FE65 gezeigt werden. In diesem Versuch wurden prp48 (PREL1 AS 1-420) und Mena als potentielle Bindungspartner für diese Domäne identifiziert (Ermekova et al., 1997). Allerdings zeigte PREL1 nur eine sehr schwache Bindung an die WW Domäne, was mit der Tatsache zusammenhängen könnte, dass in PREL1 kein eindeutiges Bindungsmotiv für Klasse II WW Domänen vorliegt und die Bindung daher indirekt über Mena vermittelt wird, welches ein PPLP Motiv in seiner prolinreichen Domäne aufweist, das für die Interaktion mit der WW Domäne verantwortlich sein kann. FE65 bindet an  $\beta$ APP (Amyloid Precursor Protein), welches in der Alzheimer Erkrankung eine Rolle spielt. Es wurde gezeigt, dass APP direkt an die SH2 Domäne von Grb2 binden kann und dass dieser Komplex im Gehirn für die neuronale Zellmigration wichtig ist (Zhou et al., 2004). Die Rolle von PREL1 in diesem Zusammenhang ist unklar, da der molekulare Mechanismus der Regulation von APP noch nicht geklärt ist und in dieser Arbeit nicht vertieft wurde.

Durch ‚pull down‘ Experimente kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Bindung der präzipitierten Proteine direkt oder indirekt ist, da *in vitro* Experimente keinen Aufschluss darüber geben, wie die tatsächliche Situation in den Zellen vorliegt. Wann und wo Interaktionen zwischen den Proteinen in den Zellen stattfinden, muss in *in vivo* Experimenten, wie in Lokalisationsstudien oder Immunpräzipitationen, bestimmt werden. Da in den ‚pull down‘ Experimenten und in Immunpräzipitationen bisher Bedingungen ohne hohe Ras-Aktivität gewählt wurden,

müssen weitere Versuche in Anwesenheit von aktiviertem Ras folgen, um die Interaktionen zu PREL1 in diesem Zusammenhang zu verifizieren und um den Zeitpunkt der Komplexbildung in den Zellen zu bestimmen.

Eine theoretisches Modell über den PREL1-Komplex in Fokalkontakten mit den für die prolinreichen Regionen und die RA Domäne identifizierten Bindungspartner ist in Abb. 4.1 dargestellt. In diesem Modell wird deutlich, dass PREL1 eine direkte Verbindung zwischen dem Ras Signalweg und dem Aktinzytoskelett über die Ena/VASP Proteine bilden kann. Wie der PREL1 Komplex an der Spitze von Lamellipodien aussieht ist nicht eindeutig geklärt, da Proteine wie Grb2 und Nck dort nicht lokalisieren (Buday et al., 2002; Tari and Lopez-Berestein, 2001). Von anderen Proteinen wie den Ena/VASP Proteinen ist eine Lokalisation an der lamellipodialen Spitze gezeigt worden (Gertler et al., 1996; Rottner et al., 1999). Evtl. hat PREL1 an der Spitze von Lamellipodien andere Bindungspartner, die noch nicht identifiziert wurden. Hier würde Abi (Abelson Interactor) in Frage kommen, da es ebenfalls an der lamellipodialen Spitze lokalisiert und mit Abl interagieren kann (Stradal et al., 2001). Auch eine Bindung von Abi an Ena/VASP Proteine konnte schon gezeigt werden (Tani et al., 2003). Eine Interaktion mit PREL1 wurde aber noch nicht untersucht.



**Abbildung 4.1: Interaktionsmodell des PREL1-Komplexes in Fokalkontakten.** PREL1 stellt in Fokalkontakten eine Verbindung zwischen Adhäsionsmolekülen und dem Ras Signalweg her, durch seine Fähigkeit Ena/VASP Proteine und die kleine GTPase Ras zu binden.

## 4.7 PREL1 lokalisiert in Podosomen

PREL1 konnte neben Fokalkontakten und der lamellipodialen Spitze auch in mit Phorbol-ester-stimulierten A7r5 Zellen in Podosomen lokalisiert werden. Podosomen sind Adhäsionsstrukturen, die eine ähnliche molekulare Zusammensetzung aufweisen wie Fokalkontakte. Im Gegensatz zu Fokalen Adhäsionspunkten (FA) sind Podosomen jedoch Arp2/3 Komplex- und WASP/N-WASP-abhängige Strukturen (Kaverina et al., 2003; Spinardi et al., 2004). Sie enthalten ein F-Aktin-reiches Zentrum, das von einem Ring aus Adhäsionsproteinen (z.B. Integrine, Vinculin, Zyxin) umgeben ist. Podosomen sind hoch dynamisch und aktiv an der Matrix-Umgestaltung und der Gewebeinvasion beteiligt (Linder and Aepfelbacher, 2003).

PREL1 kolokalisiert in Podosomen mit VASP, Grb2, Nck1, N-WASP und dem Arp2/3 Komplex. In Immunpräzipitationen mit dem polyklonalen PREL1 Antikörper 1-420 konnte GFP-N-WASP präzipitiert werden, eine Kopräzipitation von PREL1 im *vice versa* Experiment konnte aber nicht gezeigt werden. Da die Voraussetzungen einer möglichen Interaktion nicht klar sind, muss genauer definiert werden, unter welchen Bedingungen N-WASP und PREL1 möglicherweise in einem Komplex vorliegen. Andere Studien haben gezeigt, dass WASP und VASP in haematopoetischen Zellen miteinander interagieren können, eine Interaktion, die für N-WASP nicht gefunden wurde (Castellano et al., 2001). Auch aufgrund dieses Befundes ist nicht klar, ob PREL1 mit N-WASP direkt eine Interaktion eingeht oder ob der N-WASP Komplex in Podosomen indirekt mit einem VASP Komplex interagiert. Klar ist, dass N-WASP Grb2 und Nck binden kann, welche mit PIP2 und Cdc42 kooperieren, um N-WASP zu aktivieren und so die Arp2/3 vermittelte Aktinpolymerisation zu fördern (Carlier et al. 2000; Rohatgi et al. 2001). Da PREL1 nicht über Rho GTPasen, sondern über Ras reguliert wird, scheint es mit der Bindung an VASP, Abl, Grb2 und Nck einen anderen Signalweg zu vermitteln. Eine genaue Untersuchung von Podosomen in Makrophagen, die nur das haematopoetische WASP exprimieren, ist daher ein logischer nächster Schritt zum Verständnis dieser Strukturen.

## 4.8 PREL1 lokalisiert in der Immunologischen Synapse

Im Rahmen dieser Arbeit konnten polyklonale Antikörper gegen PREL1 generiert werden, die im Western Blot spezifisch endogenes PREL1 in Organen der Maus



erkennen. Es wurde dabei auch im Northern Blot deutlich, dass PREL1 im haematopoetischen System angereichert ist, da die stärksten Signale einer PREL1 Expression in Milz und Thymus auftraten (siehe Abb. 3.7 und 3.10).

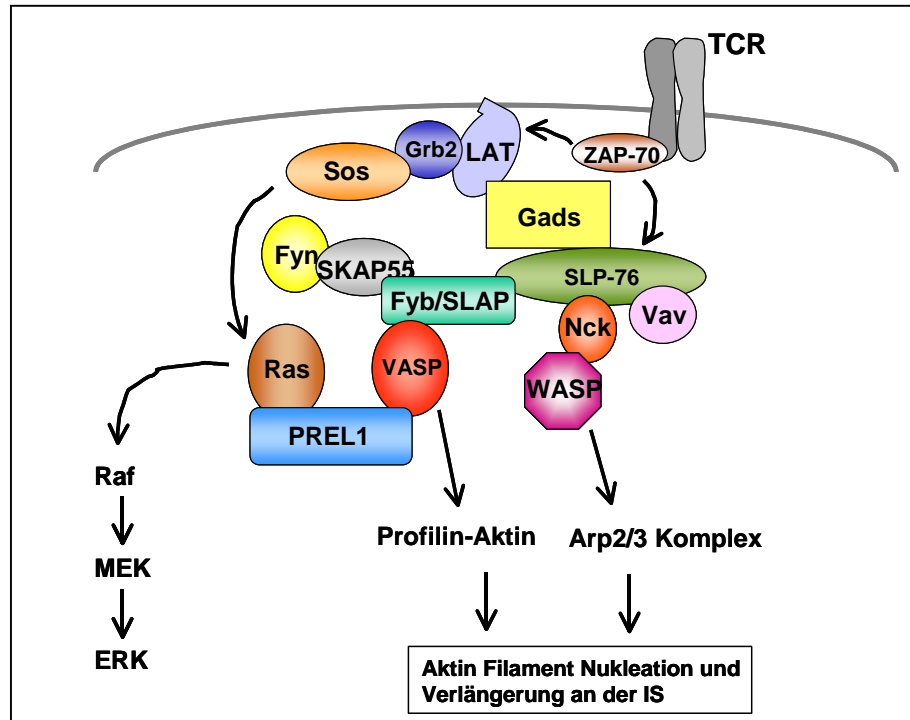
In diesen Organen findet man Zellen des Immunsystems, wie B-Zellen und T-Zellen, die bestimmte Antigenrezeptoren auf ihren Oberflächen exprimieren. Während der Interaktion mit Antigenpräsentierenden Zellen (APCs) werden über T-Zell Antigenrezeptoren (TCR) Signale übertragen, die zu einer Umgestaltung des Aktinzytoskeletts führen. Diese Umgestaltung ist für eine komplette Aktivierung der T-Zellen wichtig (Cannon and Burkhardt, 2002). Bei einer Interaktion zwischen TCR und APC kommt es zu der Ausbildung von molekularen ‚Clustern‘, die eine Struktur bilden, welche als Immunologische Synapse (IS) bezeichnet wird (Sechi and Wehland, 2004). Dabei wird Ras in einer schnellen und anhaltenden Antwort durch den TCR aktiviert (Cantrell, 2003), was wiederum zu einer Aktivierung des Erk/MAP Signalwegs führt.

PREL1 konnte an der Interaktionsoberfläche zwischen interagierenden T-Zellen und B-Zellen in der Immunologischen Synapse lokalisiert werden. Es kolokalisiert dort mit den Ena/VASP Proteinen VASP und Evl, die in der IS in die Reorganisation des Aktinzytoskeletts involviert sind (Coppolino et al., 2001). Weitere Proteine, die in der IS lokalisieren sind Fyb/SLAP (Fyn-binding/SLP-76-associated protein), welches an die EVH1 Domäne von VASP und an SLP-76 (SH2-domain-containing leukocyte protein of 76kDa) bindet (Krause et al., 2000). SLP-76 interagiert mit Nck und Vav, was zu der Rekrutierung von WASP an die IS führt (Zeng et al., 2003). Während der T-Zell Aktivierung kommt es weiterhin zu einer Rekrutierung von Grb2 und Sos an die IS, was eine Aktivierung des Ras/ERK/MAPK Signalweges induziert (Simeoni et al., 2004).

Die Proteintyrosin-Kinase Fyn wird während der TCR Aktivierung an die IS rekrutiert und bindet über die SH2 Domäne SKAP55 (Src kinase associated phosphoprotein of 55 kDa), Fyb/SLAP /ADAP (Fyn-binding/SLP-76-associated phosphoprotein/ adhesion and degranulation promoting adaptor protein) und WASP (Togni et al., 2004). Ein Modell dieses Komplexes in der IS unter Beteiligung von PREL1 ist in Abbildung 4.2 dargestellt.

Die Funktion von PREL1 in der IS ist unklar. Da PREL1 im haematopoetischen System allerdings stark angereichert ist, übernimmt PREL1 wahrscheinlich eine

Funktion bei der Umgestaltung des Aktinzytoskeletts während der Bildung der IS, indem es an Ena/VASP Proteine bindet und eine Verbindung zum Ras Signalweg herstellt.



**Abbildung 4.2: PREL1 ist Teil eines multimolekularen Komplexes in der IS.**

Nach Aktivierung des T-Zell Rezeptors (TCR) kommt es zu der Bildung der Immunologischen Synapse (IS) und einer Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts, an der eine Vielzahl von Signalmolekülen und Proteinen des Zytoskeletts beteiligt sind.

LAT, Linker of activation of T cells; ZAP-70,  $\zeta$ -associated protein of 70 kDa; Vav, GEF for small GTPases Rac and Cdc42; Gads, Grb2-related adaptor downstream of Shc; WASP, Wiskott-Aldrich Syndrome Protein; Sos, Son of sevenless

## 5 Zusammenfassung

Ena/VASP Proteine spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der Zellbewegung. Sie sind involviert in Aktin-abhängige Prozesse wie der Axon-Ausbildung, Blutplättchen-Aggregation, T-Zell Aktivierung, Phagozytose, Zell-Zell-Adhäsion oder die intrazelluläre Bewegung von bakteriellen Pathogenen (*L. monocytogenes*). Die genaue Rolle der Ena/VASP Proteine in diesen Prozessen ist allerdings noch nicht genau verstanden (Kwiatkowski et al., 2003).

In dieser Arbeit wurde PREL1 (Proline Rich EVH1 Ligand 1) als neuer Interaktionspartner der Ena/VASP Proteine charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass PREL1 mit Ena/VASP Proteinen an der Spitze von Lamellipodien, in Fokalkontakten und mit Podosomen kolokalisiert. Weiterhin konnte die direkte Interaktion von PREL1 mit Mena und VASP in Immunpräzipitationen und ‚pull down‘ Experimenten gezeigt und das Bindungsmotiv der EVH1 Domäne in PREL1 identifiziert werden. Neben Ena/VASP Proteinen konnten weitere Bindungspartner von PREL1, die SH2/SH3 Adaptor Proteine Grb2 und Nck sowie die Abelson Tyrosin Kinase (Abl), identifiziert werden. Aufgrund der Lokalisation von PREL1 und der Funktionen der kopräzipitierten Interaktionspartner in Zellen ist anzunehmen, dass diese Proteine in einem multimolekularen Komplex mit PREL1 vorliegen und in der Zellmigration eine Rolle spielen.

Weitere Ergebnisse dieser Arbeit haben ergeben, dass PREL1 über seine Ras-Assoziations (RA)-Domäne in Abhängigkeit einer intakten Pleckstrin-Homologie (PH)-Domäne spezifisch an die kleine GTPase Ras und an Phosphoinositide bindet. Eine Untersuchung der Funktion von PREL1 zeigte, dass die Lokalisation von PREL1 mit Ras-Aktivierung korreliert. Ist der Anteil an RasGTP in den Zellen hoch, findet eine Rekrutierung von PREL1 an Stellen aktiver Aktindynamik statt, wo es dann an Interaktionspartner wie Ena/VASP Proteine binden kann.

Eine weitere Rolle spielt PREL1 im haematopoetischen System, wo das Protein in hohem Maße exprimiert wird und bei T-Zell/B-Zell Interaktion in der Immunologischen Synapse mit Ena/VASP Proteinen kolokalisiert.

Über die Funktion von PREL1 speziell im haematopoetischen System ist noch nichts bekannt. Diese Arbeit hat allerdings verdeutlicht, dass PREL1 ein potentieller Linker zwischen dem Ras-Signalweg und dem Aktinzytoskelett über die Bindung an

Ena/VASP Proteine darstellt. Weitere Arbeiten an diesem Protein sollen zu einer Klärung der speziellen Rolle von PREL1 in der Regulation der Zellbewegung führen.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abercrombie, M., Heaysman, J.E. and Pegrum, S.M. (1970) The locomotion of fibroblasts in culture. II. "RRuffling". *Exp Cell Res*, **60**, 437-444.
- Allen, W.E., Jones, G.E., Pollard, J.W. and Ridley, A.J. (1997) Rho, Rac and Cdc42 regulate actin organization and cell adhesion in macrophages. *J Cell Sci*, **110** (Pt 6), 707-720.
- Allen, W.E., Zicha, D., Ridley, A. and Jones, G.E. (1998) A role for Cdc42 in macrophage chemotaxis. *J Cell Biol*, **141**, 1147-1157.
- Bachmann, C., Fischer, L., Walter, U. and Reinhard, M. (1999) The EVH2 domain of the vasodilator-stimulated phosphoprotein mediates tetramerization, F-actin binding, and actin bundle formation. *J Biol Chem*, **274**, 23549-23557.
- Ball, L.J., Jarchau, T., Oschkinat, H. and Walter, U. (2002) EVH1 domains: structure, function and interactions. *FEBS Lett*, **513**, 45-52.
- Ball, L.J., Kuhne, R., Hoffmann, B., Hafner, A., Schmieder, P., Volkmer-Engert, R., Hof, M., Wahl, M., Schneider-Mergener, J., Walter, U., Oschkinat, H. and Jarchau, T. (2000) Dual epitope recognition by the VASP EVH1 domain modulates polyproline ligand specificity and binding affinity. *Embo J*, **19**, 4903-4914.
- Bar-Sagi, D. and Hall, A. (2000) Ras and Rho GTPases: a family reunion. *Cell*, **103**, 227-238.
- Bar-Sagi, D., Rotin, D., Batzer, A., Mandiyan, V. and Schlessinger, J. (1993) SH3 domains direct cellular localization of signaling molecules. *Cell*, **74**, 83-91.
- Bear, J.E. and al., e. (2002) Antagonism between Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility. *Cell*, **109**, 509-521.
- Bear, J.E., Loureiro, J.J., Libova, I., Fassler, R., Wehland, J. and Gertler, F.B. (2000) Negative regulation of fibroblast motility by Ena/VASP proteins. *Cell*, **101**, 717-728.
- Benesch, S., Lommel, S., Steffen, A., Stradal, T.E., Scaplehorn, N., Way, M., Wehland, J. and Rottner, K. (2002) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>)-induced vesicle movement depends on N-WASP and involves Nck, WIP, and Grb2. *J Biol Chem*, **277**, 37771-37776.
- Bishop, A. and Hall, A. (2000) Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J*, **348**, 241-255.
- Bottomley, M.J., Salim, K. and Panayotou, G. (1998) Phospholipid-binding protein domains. *Biochim Biophys Acta*, **1436**, 165-183.
- Boujemaa-Paterski, R., Gouin, E., Hansen, G., Samarin, S., Le Clainche, C., Didry, D., Dehoux, P., Cossart, P., Kocks, C., Carlier, M.F. and Pantaloni, D. (2001) Listeria protein ActA mimics WASp family proteins: it activates filament barbed end branching by Arp2/3 complex. *Biochemistry*, **40**, 11390-11404.
- Buday, L. (1999) Membrane-targeting of signalling molecules by SH2/SH3 domain-containing adaptor proteins. *Biochim Biophys Acta*, **1422**, 187-204.
- Buday, L., Wunderlich, L. and Tamas, P. (2002) The Nck family of adapter proteins: regulators of actin cytoskeleton. *Cell Signal*, **14**, 723-731.
- Cannon, J.L. and Burkhardt, J.K. (2002) The regulation of actin remodeling during T-cell-APC conjugate formation. *Immunol Rev*, **186**, 90-99.
- Cantrell, D.A. (2003) GTPases and T cell activation. *Immunol Rev*, **192**, 122-130.
- Carlier, M.F. and Pantaloni, D. (1997) Control of actin dynamics in cell motility. *J Mol Biol*, **269**, 459-467.

- Carlier, M.F., Laurent, V., Santolini, J., Melki, R., Didry, D., Xia, G.X., Hong, Y., Chua, N.H. and Pantaloni, D. (1997) Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *J Cell Biol*, **136**, 1307-1322.
- Castellano, F., Le Clainche, C., Patin, D., Carlier, M.F. and Chavrier, P. (2001) A WASp-VASP complex regulates actin polymerization at the plasma membrane. *Embo J*, **20**, 5603-5614.
- Chakraborty, T., Ebel, F., Domann, E., Niebuhr, K., Gerstel, B., Pistor, S., Temm-Grove, C.J., Jockusch, B.M., Reinhard, M., Walter, U. and et al. (1995) A focal adhesion factor directly linking intracellularly motile *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* to the actin-based cytoskeleton of mammalian cells. *Embo J*, **14**, 1314-1321.
- Cheng, H., Li, H. and He, X. (1994) [The effects of extracellular matrix on Sertoli cells of rats in vitro]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*, **16**, 296-301.
- Clark, E.A. and Hynes, R.O. (1996) Ras activation is necessary for integrin-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase 2 and cytosolic phospholipase A2 but not for cytoskeletal organization. *J Biol Chem*, **271**, 14814-14818.
- Comer, A.R., Ahern-Djamali, S.M., Juang, J.L., Jackson, P.D. and Hoffmann, F.M. (1998) Phosphorylation of Enabled by the *Drosophila* Abelson tyrosine kinase regulates the in vivo function and protein-protein interactions of Enabled. *Mol Cell Biol*, **18**, 152-160.
- Cooper, J.A. (1987) Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol*, **105**, 1473-1478.
- Coppolino, M.G., Krause, M., Hagendorff, P., Monner, D.A., Trimble, W., Grinstein, S., Wehland, J. and Sechi, A.S. (2001) Evidence for a molecular complex consisting of Fyb/SLAP, SLP-76, Nck, VASP and WASP that links the actin cytoskeleton to Fcγ receptor signalling during phagocytosis. *J Cell Sci*, **114**, 4307-4318.
- Daly, R.J. (1998) The Grb7 family of signalling proteins. *Cell Signal*, **10**, 613-618.
- De Vet, E.C., Aguado, B. and Campbell, R.D. (2003) Adaptor signalling proteins Grb2 and Grb7 are recruited by human G6f, a novel member of the immunoglobulin superfamily encoded in the MHC. *Biochem J*, **375**, 207-213.
- Di Fiore, P.P. and Scita, G. (2002) Eps8 in the midst of GTPases. *Int J Biochem Cell Biol*, **34**, 1178-1183.
- Downward, J., Graves, J. and Cantrell, D. (1992) The regulation and function of p21ras in T cells. *Immunol Today*, **13**, 89-92.
- Egan, S.E., Giddings, B.W., Brooks, M.W., Buday, L., Sizeland, A.M. and Weinberg, R.A. (1993) Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation. *Nature*, **363**, 45-51.
- Egile, C., Loisel, T.P., Laurent, V., Li, R., Pantaloni, D., Sansonetti, P.J. and Carlier, M.F. (1999) Activation of the CDC42 effector N-WASP by the *Shigella flexneri* IcsA protein promotes actin nucleation by Arp2/3 complex and bacterial actin-based motility. *J Cell Biol*, **146**, 1319-1332.
- El-Shemerly, M.Y.M., Besser, D., Nagasawa, M. and Nagamine, Y. (1997) 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate Activates the Ras/Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) Signaling Pathway Upstream of Sos Involving Serine Phosphorylation of Shc in NIH3T3 Cells. *J Biol Chem*, **272**, 30599-30602.
- Ermekova, K.S., Zambrano, N., Linn, H., Minopoli, G., Gertler, F., Russo, T. and Sudol, M. (1997) The WW domain of neural protein FE65 interacts with

- proline-rich motifs in Mena, the mammalian homolog of Drosophila Enabled. *J Biol Chem*, **272**, 32869-32877.
- Evangelista, M., Klebl, B.M., Tong, A.H., Webb, B.A., Leeuw, T., Leberer, E., Whiteway, M., Thomas, D.Y. and Boone, C. (2000) A role for myosin-I in actin assembly through interactions with Vrp1p, Bee1p, and the Arp2/3 complex. *J Cell Biol*, **148**, 353-362.
- Feng, S., Chen, J.K., Yu, H., Simon, J.A. and Schreiber, S.L. (1994) Two binding orientations for peptides to the Src SH3 domain: development of a general model for SH3-ligand interactions. *Science*, **266**, 1241-1247.
- Frantz, J.D., Giorgetti-Peraldi, S., Ottinger, E.A. and Shoelson, S.E. (1997) Human GRB-IRbeta/GRB10. Splice variants of an insulin and growth factor receptor-binding protein with PH and SH2 domains. *J Biol Chem*, **272**, 2659-2667.
- Frischknecht, F., Moreau, V., Rottger, S., Gonfloni, S., Reckmann, I., Superti-Furga, G. and Way, M. (1999) Actin-based motility of vaccinia virus mimics receptor tyrosine kinase signalling. *Nature*, **401**, 926-929.
- Garcia Arguinzonis, M.I., Galler, A.B., Walter, U., Reinhard, M. and Simm, A. (2002) Increased spreading, Rac/p21-activated kinase (PAK) activity, and compromised cell motility in cells deficient in vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP). *J Biol Chem*, **277**, 45604-45610.
- Gertler, F., Doctor, J.S. and Hoffmann, F.M. (1990) Genetic suppression of mutations in the Drosophila abl proto-oncogene homolog. *Science*, **248**, 857-860.
- Gertler, F.B., Niebuhr, K., Reinhard, M., Wehland, J. and Soriano, P. (1996) Mena, a relative of VASP and Drosophila Enabled, is implicated in the control of microfilament dynamics. *Cell*, **87**, 227-239.
- Goicoechea, S.M., Tu, Y., Hua, Y., Chen, K., Shen, T.L., Guan, J.L. and Wu, C. (2002) Nck-2 interacts with focal adhesion kinase and modulates cell motility. *Int J Biochem Cell Biol*, **34**, 791-805.
- Goldschmidt-Clermont, P.J., Machesky, L.M., Doberstein, S.K. and Pollard, T.D. (1991) Mechanism of the interaction of human platelet profilin with actin. *J Cell Biol*, **113**, 1081-1089.
- Halbrugge, M. and Walter, U. (1989) Purification of a vasodilator-regulated phosphoprotein from human platelets. *Eur J Biochem*, **185**, 41-50.
- Hall, A. (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*, **279**, 509-514.
- Han, D.C. and Guan, J.L. (1999) Association of focal adhesion kinase with Grb7 and its role in cell migration. *J Biol Chem*, **274**, 24425-24430.
- Han, D.C., Shen, T.L. and Guan, J.L. (2000) Role of Grb7 targeting to focal contacts and its phosphorylation by focal adhesion kinase in regulation of cell migration. *J Biol Chem*, **275**, 28911-28917.
- Han, D.C., Shen, T.L. and Guan, J.L. (2001) The Grb7 family proteins: structure, interactions with other signaling molecules and potential cellular functions. *Oncogene*, **20**, 6315-6321.
- Holly, S., Larson, M.K. and Parise, L.V. (2000) Multiple roles of Integrins in cell motility. *Exp Cell Res*, **261**, 69-74.
- Howe, A.K., Hogan, B.P. and Juliano, R.L. (2002) Regulation of vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation and interaction with Abl by protein kinase A and cell adhesion. *J Biol Chem*, **277**, 38121-38126.
- Hu, H., Columbus, J., Zhang, Y., Wu, D., Lian, L., Yang, S., Goodwin, J., Luczak, C., Carter, M., Chen, L., James, M., Davis, R., Sudol, M., Rodwell, J. and Herrero, J.J. (2004) A map of WW domain family interactions. *Proteomics*, **4**, 643-655.

- Hufner, K., Schell, B., Aepfelbacher, M. and Linder, S. (2002) The acidic regions of WASp and N-WASP can synergize with CDC42Hs and Rac1 to induce filopodia and lamellipodia. *FEBS Lett*, **514**, 168-174.
- Hughes, P.E., Renshaw, M.W., Pfaff, M., Forsyth, J., Keivens, V.M., Schwartz, M.A. and Ginsberg, M.H. (1997) Suppression of integrin activation: a novel function of a Ras/Raf-initiated MAP kinase pathway. *Cell*, **88**, 521-530.
- Huttelmaier, S., Harbeck, B., Steffens, O., Messerschmidt, T., Illenberger, S. and Jockusch, B.M. (1999) Characterization of the actin binding properties of the vasodilator-stimulated phosphoprotein. *FEBS Lett*, **451**, 68-74.
- Inagaki, T., Suzuki, S., Miyamoto, T., Takeda, T., Yamashita, K., Komatsu, A., Yamauchi, K. and Hashizume, K. (2003) The retinoic acid-responsive proline-rich protein is identified in promyeloleukemic HL-60 cells. *J Biol Chem*, **278**, 51685-51692.
- Izzard, C.S. and Lochner, L.R. (1976) Cell-to-substrate contacts in living fibroblasts: an interference reflexion study with an evaluation of the technique. *J Cell Sci*, **21**, 129-159.
- Janes, P.W., Lackmann, M., Church, W.B., Sanderson, G.M., Sutherland, R.L. and Daly, R.J. (1997) Structural determinants of the interaction between the erbB2 receptor and the Src homology 2 domain of Grb7. *J Biol Chem*, **272**, 8490-8497.
- Jiang, X., Huang, F., Marusyk, A. and Sorkin, A. (2003) Grb2 regulates internalization of EGF receptors through clathrin-coated pits. *Mol Biol Cell*, **14**, 858-870.
- Kato, A., Ozawa, F., Saitoh, Y., Fukazawa, Y., Sugiyama, H. and Inokuchi, K. (1998) Novel members of the Vesl/Homer family of PDZ proteins that bind metabotropic glutamate receptors. *J Biol Chem*, **273**, 23969-23975.
- Kaverina, I., Stradal, T.E. and Gimona, M. (2003) Podosome formation in cultured A7r5 vascular smooth muscle cells requires Arp2/3-dependent de-novo actin polymerization at discrete microdomains. *J Cell Sci*, **116**, 4915-4924.
- Kay, B.K., Williamson, M.P. and Sudol, M. (2000) The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *Faseb J*, **14**, 231-241.
- Kinbara, K., Goldfinger, L.E., Hansen, M., Chou, F.L. and Ginsberg, M.H. (2003) Ras GTPases: integrins' friends or foes? *Nat Rev Mol Cell Biol*, **4**, 767-776.
- Korn, E.D., Carlier, M.F. and Pantaloni, D. (1987) Actin polymerization and ATP hydrolysis. *Science*, **238**, 638-644.
- Krause, M., Dent, E.W., Bear, J.E., Loureiro, J.J. and Gertler, F.B. (2003) Ena/VASP proteins: regulators of the actin cytoskeleton and cell migration. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **19**, 541-564.
- Krause, M., Sechi, A.S., Konradt, M., Monner, D., Gertler, F.B. and Wehland, J. (2000) Fyn-binding protein (Fyb)/SLP-76-associated protein (SLAP), Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) proteins and the Arp2/3 complex link T cell receptor (TCR) signaling to the actin cytoskeleton. *J Cell Biol*, **149**, 181-194.
- Krugmann, S., Jordens, I., Gevaert, K., Driessens, M., Vandekerckhove, J. and Hall, A. (2001) Cdc42 induces filopodia by promoting the formation of an IRSp53:Mena complex. *Curr Biol*, **11**, 1645-1655.
- Lambrechts, A., Kwiatkowski, A.V., Lanier, L.M., Bear, J.E., Vandekerckhove, J., Ampe, C. and Gertler, F.B. (2000) cAMP-dependent protein kinase



- phosphorylation of EVL, a Mena/VASP relative, regulates its interaction with actin and SH3 domains. *J Biol Chem*, **275**, 36143-36151.
- Lanier, L.M., Gates, M.A., Witke, W., Menzies, A.S., Wehman, A.M., Macklis, J.D. and al., e. (1999) Mena is required for neurulation and commissure formation. *Neuron*, **22**, 313-325.
- Laurent, V., Loisel, T.P., Harbeck, B., Wehman, A., Grobe, L., Jockusch, B.M., Wehland, J., Gertler, F.B. and Carlier, M.F. (1999) Role of proteins of the Ena/VASP family in actin-based motility of *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol*, **144**, 1245-1258.
- Leavey, S.F., Arend, L.J., Dare, H., Dressler, G.R., Briggs, J.P. and Margolis, B.L. (1998) Expression of Grb7 growth factor receptor signaling protein in kidney development and in adult kidney. *Am J Physiol*, **275**, F770-776.
- Lemmon, M.A. (2003) Phosphoinositide recognition domains. *Traffic*, **4**, 201-213.
- Li, W., Fan, J. and Woodley, D.T. (2001) Nck/Dock: an adapter between cell surface receptors and the actin cytoskeleton. *Oncogene*, **20**, 6403-6417.
- Lim, M.A., Riedel, H. and Liu, F. (2004) Grb10: more than a simple adaptor protein. *Front Biosci*, **9**, 387-403.
- Linder, S. and Aepfelbacher, M. (2003) Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells. *Trends Cell Biol*, **13**, 376-385.
- Loisel, T.P., Boujemaa, R., Pantaloni, D. and Carlier, M.F. (1999) Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature*, **401**, 613-616.
- Lommel, S., Benesch, S., Rohde, M., Wehland, J. and Rottner, K. (2004) Enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* use different mechanisms for actin pedestal formation that converge on N-WASP. *Cell Microbiol*, **6**, 243-254.
- Lommel, S., Benesch, S., Rottner, K., Franz, T., Wehland, J. and Kuhn, R. (2001) Actin pedestal formation by enteropathogenic *Escherichia coli* and intracellular motility of *Shigella flexneri* are abolished in N-WASP-defective cells. *EMBO Rep*, **2**, 850-857.
- Machesky, L.M., Atkinson, S.J., Ampe, C., Vandekerckhove, J. and Pollard, T.D. (1994) Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity chromatography on profilin-agarose. *J Cell Biol*, **127**, 107-115.
- Machesky, L.M., Mullins, R.D., Higgs, H.N., Kaiser, D.A., Blanchoin, L., May, R.C., Hall, M.E. and Pollard, T.D. (1999) Scar, a WASp-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 3739-3744.
- Macias, M.J., Wiesner, S. and Sudol, M. (2002) WW and SH3 domains, two different scaffolds to recognize proline-rich ligands. *FEBS Lett*, **513**, 30-37.
- Manser, J. and Wood, W.B. (1990) Mutations affecting embryonic cell migrations in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Genet*, **11**, 49-64.
- Manser, J., Roonprapunt, C. and Margolis, B. (1997) *C. elegans* cell migration gene mig-10 shares similarities with a family of SH2 domain proteins and acts cell nonautonomously in excretory canal development. *Dev Biol*, **184**, 150-164.
- Matsudaira, P. (1994) Actin crosslinking proteins at the leading edge. *Semin Cell Biol*, **5**, 165-174.
- Medema, R.H. and Bos, J.L. (1993) The role of p21ras in receptor tyrosine kinase signaling. *Crit Rev Oncog*, **4**, 615-661.

- Mitchison, T.J. and Cramer, L.P. (1996) Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell*, **84**, 371-379.
- Mongiovi, A.M., Romano, P.R., Panni, S., Mendoza, M., Wong, W.T., Musacchio, A., Cesareni, G. and Di Fiore, P.P. (1999) A novel peptide-SH3 interaction. *Embo J*, **18**, 5300-5309.
- Montessuit, C. and Thorburn, A. (1999) Activation of Ras by phorbol esters in cardiac myocytes. Role of guanine nucleotide exchange factors. *FEBS Lett*, **460**, 57-60.
- Mullins, R.D. and Pollard, T.D. (1999) Structure and function of the Arp2/3 complex. *Curr Opin Struct Biol*, **9**, 244-249.
- Mullins, R.D., Heuser, J.A. and Pollard, T.D. (1998) The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 6181-6186.
- Niebuhr, K., Ebel, F., Frank, R., Reinhard, M., Domann, E., Carl, U.D., Walter, U., Gertler, F.B., Wehland, J. and Chakraborty, T. (1997) A novel proline-rich motif present in ActA of *Listeria monocytogenes* and cytoskeletal proteins is the ligand for the EVH1 domain, a protein module present in the Ena/VASP family. *Embo J*, **16**, 5433-5444.
- Nobes, C.D. and Hall, A. (1999) Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol*, **144**, 1235-1244.
- Pantaloni, D., Boujemaa, R., Didry, D., Gounon, P. and Carlier, M.F. (2000) The Arp2/3 complex branches filament barbed ends: functional antagonism with capping proteins. *Nat Cell Biol*, **2**, 385-391.
- Pantaloni, D., Le Clainche, C. and Carlier, M.F. (2001) Mechanism of actin-based motility. *Science*, **292**, 1502-1506.
- Pawson, T. (1995) Protein modules and signalling networks. *Nature*, **373**, 573-580.
- Pollard, T.D., Blanchoin, L. and Mullins, R.D. (2000) Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **29**, 545-576.
- Reinhard, M., Giehl, K., Abel, K., Haffner, C., Jarchau, T., Hoppe, V., Jockusch, B.M. and Walter, U. (1995) The proline-rich focal adhesion and microfilament protein VASP is a ligand for profilins. *Embo J*, **14**, 1583-1589.
- Reinhard, M., Jarchau, T. and Walter, U. (2001) Actin-based motility: stop and go with Ena/VASP proteins. *Trends Biochem Sci*, **26**, 243-249.
- Reinhard, M., Rudiger, M., Jockusch, B.M. and Walter, U. (1996) VASP interaction with vinculin: a recurring theme of interactions with proline-rich motifs. *FEBS Lett*, **399**, 103-107.
- Renshaw, M.W., Lewis, J.M. and Schwartz, M.A. (2000) The c-Abl tyrosine kinase contributes to the transient activation of MAP kinase in cells plated on fibronectin. *Oncogene*, **19**, 3216-3219.
- Reuther, G.W. and Der, C.J. (2000) The Ras branch of small GTPases: Ras family members don't fall far from the tree. *Curr Opin Cell Biol*, **12**, 157-165.
- Ridley, A. and Hall, A. (1992) The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibres in response to growth factors. *Cell*, **70**, 389-399.
- Ridley, A.J. (2001a) Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends Cell Biol*, **11**, 471-477.
- Ridley, A.J. (2001b) Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci*, **114**, 2713-2722.

- Rohatgi, R., Ma, L., Miki, H., Lopez, M., Kirchhausen, T., Takenawa, T. and Kirschner, M.W. (1999) The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell*, **97**, 221-231.
- Rottner, K., Behrendt, B., Small, J.V. and Wehland, J. (1999) VASP dynamics during lamellipodia protrusion. *Nat Cell Biol*, **1**, 321-322.
- Rottner, K., Hall, A. and Small, J.V. (1999b) Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. *Curr Biol*, **9**, 640-648.
- Rottner, K., Krause, M., Gimona, M., Small, J.V. and Wehland, J. (2001) Zyxin is not colocalized with vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) at lamellipodial tips and exhibits different dynamics to vinculin, paxillin, and VASP in focal adhesions. *Mol Biol Cell*, **12**, 3103-3113.
- Scaplehorn, N., Holmstrom, A., Moreau, V., Frischknecht, F., Reckmann, I. and Way, M. (2002) Grb2 and Nck act cooperatively to promote actin-based motility of vaccinia virus. *Curr Biol*, **12**, 740-745.
- Schlaepfer, D.D., Hanks, S.K., Hunter, T. and van der Geer, P. (1994) Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature*, **372**, 786-791.
- Schluter, K., Jockusch, B.M. and Rothkegel, M. (1997) Profilins as regulators of actin dynamics. *Biochim Biophys Acta*, **1359**, 97-109.
- Sechi, A.S. and Wehland, J. (2004) Interplay between TCR signalling and actin cytoskeleton dynamics. *Trends Immunol*, **25**, 257-265.
- Sechi, A.S. and Wehland, J. (2004) ENA/VASP proteins: multifunctional regulators of actin cytoskeleton dynamics. *Front Biosci*, **9**, 1294-1310.
- Shen, T.L., Han, D.C. and Guan, J.L. (2002) Association of Grb7 with phosphoinositides and its role in the regulation of cell migration. *J Biol Chem*, **277**, 29069-29077.
- Simeoni, L., Kliche, S., Lindquist, J. and Schraven, B. (2004) Adaptors and linkers in T and B cells. *Curr Opin Immunol*, **16**, 304-313.
- Skoble, J., Portnoy, D.A. and Welch, M.D. (2000) Three regions within ActA promote Arp2/3 complex-mediated actin nucleation and *Listeria monocytogenes* motility. *J Cell Biol*, **150**, 527-538.
- Small, J., Rottner, K., Hahne, P. and Anderson, K.I. (1999) Visualising the actin cytoskeleton. *Microsc Res Tech*, **47**, 3-17.
- Small, J.V. (1982) Organization of actin meshworks in cultured cells: the leading edge. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **46**, 599-611.
- Small, J.V. (1988) The actin cytoskeleton. *Electron Microsc Rev*, **1**, 155-174.
- Small, J.V. (1994) Lamellipodia architecture: actin filament turnover and the lateral flow of actin filaments during motility. *Semin Cell Biol*, **5**, 157-163.
- Small, J.V. (1995) Getting the actin filaments straight: nucleation-release or treadmill? *Trends Cell Biol*, **5**, 52-55.
- Small, J.V., Isenberg, G. and Celis, J.E. (1978) Polarity of actin at the leading edge of cultured cells. *Nature*, **272**, 638-639.
- Small, J.V., Stradal, T., Vignal, E. and Rottner, K. (2002) The lamellipodium: where motility begins. *Trends Cell Biol*, **12**, 112-120.
- Sohn, R.H. and Goldschmidt-Clermont, P.J. (1994) Profilin: at the crossroads of signal transduction and the actin cytoskeleton. *Bioessays*, **16**, 465-472.
- Stapley, B.J. and Creamer, T.P. (1999) A survey of left-handed polyproline II helices. *Protein Sci*, **8**, 587-595.
- Stein, D., Wu, J., Fuqua, S.A., Roonprapunt, C., Yajnik, V., D'Eustachio, P., Moskow, J.J., Buchberg, A.M., Osborne, C.K. and Margolis, B. (1994) The

- SH2 domain protein GRB-7 is co-amplified, overexpressed and in a tight complex with HER2 in breast cancer. *Embo J*, **13**, 1331-1340.
- Stradal, T., Courtney, K.D., Rottner, K., Hahne, P., Small, J.V. and Pendergast, A.M. (2001) The Abl interactor proteins localize to sites of actin polymerization at the tips of lamellipodia and filopodia. *Curr Biol*, **11**, 891-895.
- Sudol, M. (1998) From Src Homology domains to other signaling modules: proposal of the 'protein recognition code'. *Oncogene*, **17**, 1469-1474.
- Sudol, M. and Hunter, T. (2000) NeW wrinkles for an old domain. *Cell*, **103**, 1001-1004.
- Sun, H.Q., Kwiatkowska, K. and Yin, H.L. (1995) Actin monomer binding proteins. *Curr Opin Cell Biol*, **7**, 102-110.
- Svitkina, T.M. and Borisy, G.G. (1999) Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J Cell Biol*, **145**, 1009-1026.
- Svitkina, T.M., Bulanova, E.A., Chaga, O.Y., Vignjevic, D.M., Kojima, S., Vasiliev, J.M. and Borisy, G.G. (2003) Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *J Cell Biol*, **160**, 409-421.
- Tani, K., Sato, S., Sukezane, T., Kojima, H., Hirose, H., Hanafusa, H. and Shishido, T. (2003) Abl interactor 1 promotes tyrosine 296 phosphorylation of mammalian enabled (Mena) by c-Abl kinase. *J Biol Chem*, **278**, 21685-21692.
- Walsh, A.B. and Bar-Sagi, D. (2001) Differential activation of the Rac pathway by Ha-Ras and K-Ras. *J Biol Chem*, **276**, 15609-15615.
- Wang, Y.L. (1985) Exchange of actin subunits at the leading edge of living fibroblasts: possible role of treadmilling. *J Cell Biol*, **101**, 597-602.
- Weaver, A.M., Karginov, A.V., Kinley, A.W., Weed, S.A., Li, Y., Parsons, J.T. and Cooper, J.A. (2001) Cortactin promotes and stabilizes Arp2/3-induced actin filament network formation. *Curr Biol*, **11**, 370-374.
- Wegner, A. and Isenberg, G. (1983) 12-fold difference between the critical monomer concentrations of the two ends of actin filaments in physiological salt conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **80**, 4922-4925.
- Welch, M.D. (1999) The world according to Arp: regulation of actin nucleation by the Arp2/3 complex. *Trends Cell Biol*, **9**, 423-427.
- Welch, M.D. and Mullins, R.D. (2002) Cellular control of actin nucleation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **18**, 247-288.
- Welch, M.D., Iwamatsu, A. and Mitchison, T.J. (1997a) Actin polymerization is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes*. *Nature*, **385**, 265-269.
- Welch, M.D., Mallavarapu, A., Rosenblatt, J. and Mitchison, T.J. (1997b) Actin dynamics in vivo. *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 54-61.
- Winter, D., Lechler, T. and Li, R. (1999) Activation of the yeast Arp2/3 complex by Bee1p, a WASP-family protein. *Curr Biol*, **9**, 501-504.
- Wittke, W. (2004) The role of profilin complexes in cell motility and other cellular processes. *Trends Cell Biol*, in press.
- Wojcik, J., Girault, J.A., Labesse, G., Chomilier, J., Mornon, J.P. and Callebaut, I. (1999) Sequence analysis identifies a ras-associating (RA)-like domain in the N-termini of band 4.1/JEF domains and in the Grb7/10/14 adapter family. *Biochem Biophys Res Commun*, **259**, 113-120.
- Woodring, P.J., Hunter, T. and Wang, J.Y. (2003) Regulation of F-actin-dependent processes by the Abl family of tyrosine kinases. *J Cell Sci*, **116**, 2613-2626.

- Woodrow, M.A., Woods, D., Cherwinski, H.M., Stokoe, D. and McMahon, M. (2003) Ras-induced serine phosphorylation of the focal adhesion protein paxillin is mediated by the Raf-->MEK-->ERK pathway. *Exp Cell Res*, **287**, 325-338.
- Woods, D., Cherwinski, H., Venetsanakos, E., Bhat, A., Gysin, S., Humbert, M., Bray, P.F., Saylor, V.L. and McMahon, M. (2001) Induction of beta3-integrin gene expression by sustained activation of the Ras-regulated Raf-MEK-extracellular signal-regulated kinase signaling pathway. *Mol Cell Biol*, **21**, 3192-3205.
- Zarrinpar, A., Bhattacharyya, R.P. and Lim, W.A. (2003) The structure and function of proline recognition domains. *Sci STKE*, 2003, RE8.
- Zeng, R., Cannon, J.L., Abraham, R.T., Way, M., Billadeau, D.D., Bubeck-Wardenberg, J. and Burkhardt, J.K. (2003) SLP-76 coordinates Nck-dependent Wiskott-Aldrich syndrome protein recruitment with Vav-1/Cdc42-dependent Wiskott-Aldrich syndrome protein activation at the T cell-APC contact site. *J Immunol*, **171**, 1360-1368.
- Zhou, D., Noviello, C., D'Ambrosio, C., Scaloni, A. and D'Adamio, L. (2004) Growth factor receptor-bound protein 2 interaction with the tail of Amyloid  $\beta$  Precursor Protein is mediated by its Src homology 2 domain. *J Biol Chem*, **279**, 25374-25380.
- Zigmond, S.H. (2000) How WASP regulates actin polymerization. *J Cell Biol*, **150**, F117-120.

## 7 Abkürzungen und Übersetzungen

A	Adenin
Ab	Antibody (Antikörper)
Abb.	Abbildung
ActA	Aktin-Nukleationsfaktor
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
arc	actin related protein complex subunit
Arp	actin related protein
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BHI	brain and heart infusion
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cDNA	complementary DNA ( komplementäre DNA)
Da	Dalton
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Ena	<i>Drosophila</i> Enabled
Ena/VASP	Enabled/vasodilator-stimulated phosphoprotein
EtOH	Ethanol
EVH1	Ena/VASP homology 1 domain
EVL	Ena/VASP-like protein
F-Aktin	filamentöses Aktin
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
G	Guanin
G-Aktin	globuläres Aktin
GAP	GTPase activating protein
GBD	GTPase-binding domain
GDI	GDP dissociation inhibitor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	guanine nucleotide exchange factor
GFP	green fluorescent protein ( grün fluoreszierendes Protein)
GS	Glutathion Sepharose
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat

h	Stunde
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
human	menschlich
IF	Immunfluoreszenz
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-β-D-galactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
konz.	konzentriert
l	Liter
LB	Luria-Bertani broth
μ	mikro
M	Molar
mA	Milliampere
mAb	monoclonal Antibody (monoklonaler Antikörper)
MCS	Multiple Cloning Site
Mena	mammalian Enabled
min	Minute
mRNA	messenger Ribonucleicacid
murine (m)	Maus
MW	molecular weight (Molekulargewicht)
NEAA	non essentiell amino acids
npg	N-Propylgalat
N-WASP	neuronal Wiskott-Aldrich syndrome protein
OD	Optische Dichte
o.g.	oben genannt
o.n.	over night (über Nacht)
ORF	Open Reading Frame (offenes Leseraster)
ori	origin of replication (Replikationsstart)
p.a.	pro analysii
pAb	polyclonal Antibody (polyklonaler Antikörper)
PBS	Phosphate Buffered Saline
pc	polyklonal
PEG	Polyethylenglycol
PFA	Paraformaldehyd
PH	Pleckstrin homology
PIP	Phosphatidylinositolphosphat
PREL	Proline Rich EVH1 Ligand
prp48	proline-rich protein 48
PR	prolinreich
PVDF	Poly-Vinylidene-Di-Fluorid
RA	Ras association
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)

---

RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
s.u.	siehe unten
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidelektrophorese
SH	Src Homology
Tab.	Tabelle
TBS	Tris Buffered Saline
TEMED	N, N, N, N-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
TX-100	TritonX-100
ÜS	Überstand
v/v	volume per volume (Volumen pro Volumen)
vgl.	Vergleiche
V	Volumen
WASP	Wiskott-Aldrich syndrome protein
w/v	weights per volume (Gewicht pro Volumen)
z.V.g.	zur Verfügung gestellt



## 8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. J. Wehland für die Bereitstellung des interessanten Themas, die Möglichkeit meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können, für seine wissenschaftliche Betreuung und die Übernahme des Referats.

Für das Interesse und die spontane Übernahme des Koreferats dieser Arbeit mein grosser Dank auch an Prof. Dr. M. Korte.

Mein ganz besonderer Dank gilt Theresia Stradal und Klemens Rottner für ihre hervorragende Betreuung, aufmunternde Unterstützung, außerordentliche Motivation und ihre unermüdliche Diskussionsbereitschaft.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Zellbiologie für das angenehme und motivierende Arbeitsklima und für ihre Hilfsbereitschaft im Laboralltag, vor allem für die ausgelassene Stimmung im Labor A2.43 bei Stefanie Benesch, Petra Hagendorff, Silvia Lommel und Anika Steffen.

Ganz besonderer Dank gilt Ronald Frank und Werner Tegge für die Peptid-Scans und die Herstellung der Peptide. Zusätzlicher Dank auch an Barbara Behrendt für das Überlassen der prp48-Daten, Anke Fabian für die GST-SH3 Domänen von Nck und Grb2 und Bastian Dornbach für die T- und B-Zellen.

Ein ganz herzliches, dickes Dankeschön an meine Mutter für ihre enorme, liebevolle Unterstützung während meines Studiums und dieser Arbeit, ohne die dies alles nicht möglich gewesen wäre und vor allem auch an Frank, dass er immer für mich da ist.